

Über das Verhalten von Enzymaktivitäten
und Adeninnucleotidegehalten in
Kaninchenerythrocyten unter cytostatischer
Behandlung

vorgelegt von
Karl-August Müller
aus Enspel

MAINZ 1972

Die Deutsche Demokratische Republik
Ministerium für Wissenschaft und
Hochschulwesen
Lehrstuhl für Mathematik
DDR, 1000 Berlin

Über die Darstellung der Funktionen $f(x)$ und $g(x)$ in der Form
von Potenzreihen

1. Einleitung

Es sei $f(x)$ eine Funktion, die in der Umgebung von x_0 definiert ist.
Wir betrachten die Entwicklung von $f(x)$ in der Form

$$f(x) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n (x - x_0)^n$$

Es gilt $a_n = \frac{f^{(n)}(x_0)}{n!}$
für $n = 0, 1, 2, \dots$

Meinen Eltern

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554401_0015

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. med. P. Schölmerich

Über das Verhalten von Enzymaktivitäten und Adeninnucleotidgehalten
in Kaninchenerythrocyten unter cytostatischer Behandlung

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät

der

Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von
Karl - August Müller
aus Enspel

MAINZ 1972



Fachbereichs-Dekan: Professor Dr. J. Fischer
Referent: Professor Dr. K. Mainzer
Korreferent: Professor Dr. P. Schölmerich

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1) Ziel der Arbeit	1
2) Azathioprin (IMJUREK ^R)	2
3) Trophosphamid, Rec INN (Zytostatikum 4828)	4
4) Vorbemerkungen zum Stoffwechsel der Erythrocyten	7
B. METHODIK	11
1) Verwendete Lösungen und Substanzen	11
2) Gewinnung von Erythrocyten und Herstellung eines zellfreien Haemolysats	13
3) Bestimmung der Enzymaktivitäten	13
a) Prinzip des UV - Tests	13
b) Messung der einzelnen Enzymaktivitäten	14
c) Berechnung der Enzymaktivitäten	
4) Messung des Adenosinphosphatgehaltes	20
5) Weitere Bestimmungsmethoden	22
6) Versuchsanordnung und -durchführung	23
7) Statistische Auswertung	25
C. VERSUCHSERGEBNISSE	27
1) Kontrolltiere	27
2) Behandlung mit Trophosphamid (10 und 20 mg/kg KG) und Placebo (physiologische NaCl - Lösung i. p.)	28
3) Behandlung mit Azathioprin (6 mg und 12 mg / kg KG) und Placebo (Wasser per os)	31
D. DISKUSSION	34
E. ZUSAMMENFASSUNG	39

Anhang

Graphische Darstellungen

Verwendete Abkürzungen und Maßeinheiten

Literaturverzeichnis

A. EINLEITUNG

1) Ziel der Arbeit

Die Entdeckung des Gärungsstoffwechsels der Tumorzellen durch O. WARBURG (1926), die in späteren Untersuchungen von anderen Autoren bestätigt wurde (BURK, 1957, GREENSTEIN, 1954, HOHORST, 1960, HORECKER und HIATT, 1958, LUNDGAARD, 1933, WOODS et al., 1955) und von der man Fortschritte in der Geschwulsttherapie erhoffte, hat bis heute keine gezielte Anwendung der Chemotherapie auf die Stoffwechseleigenheiten der Krebszellen gebracht, (BURK, 1957) da die Glykolyse quantitativ unbestritten, qualitativ (als spezielle Eigenheit der Tumorzelle) jedoch widerlegt wurde (GROSS, 1971). Die "Hemmung der Glucosephosphorylierung durch Beeinflussung von Substrat, Coenzym und Enzym" (BURK, 1957), die im Prinzip auf alle lebenden Krebszellen hätte angewendet werden können, wurde nur theoretisch entwickelt.

Die heutige Chemotherapie ist ein "Kind der Empirie" (BAUER, 1963) und die verwendeten Substanzen sind mit zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen belastet (HEILMEYER, 1954, MEYTHALER, 1961, SCHMÄHL, 1971). Schon die 1946 von HEILMEYER vorgeschlagene Sammelbezeichnung "Cytostatika" besagt nur eine zelltoxische, aber noch keine spezifisch krebszell - toxische Wirkung. Diese Beeinflussung richtet sich vor allem auf schnell wachsende Gewebe wie die Krebsgeschwülste, aber auch auf das gesunde Knochenmark, die Drüsenepithelien der Schleimhäute und die Keimdrüsen. So sind Hemmungen der Leukopoese und Thrombopoese fast allen cytostatischen Substanzen gemeinsam (BOCK, 1965, GERHARTZ, 1962, MAUSS et al., 1961, MEYTHALER, 1961, SCHMÄHL, 1971).

Aber auch die Bildung der roten Blutzellen wird beeinflusst und muß während der Therapie sorgfältig überwacht werden (MEYTHALER, 1961). Eine Verkürzung der

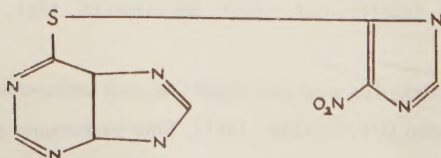
intravasalen Lebenszeit der Erythrocyten unter bestimmten Cytostatika wird von WOLF und WITTE (1960) beschrieben. Andere Autoren gelangten zum gleichen Ergebnis (MAUSS, 1963, KÜNKEL et al, 1964, STRUBELT, 1965, WOLF, et al. 1960). Diese Erythrocytenlebensdauerverkürzung unter cytostatischer Therapie beruht nach WALLER (1960) auf einer Schädigung besonders empfindlicher Enzyme der Erythrocyten. Dies soll zu einer Beschleunigung der physiologischen Alterungsvorgänge und zu einem vorzeitigen Abbau der roten Blutzellen führen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden zwei verschiedene Cytostatika mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus in ihrem Einfluß auf die Enzymaktivitäten der Erythrocyten untersucht. Dabei war die Versuchsanordnung so gewählt, daß insbesondere die möglichen Störungen der Enzymproteinsynthese beurteilt werden sollten. Aus diesem Grunde wurde die Behandlung über eine gesamte Erythrocytenlebensdauer des Kaninchens (66 ± 2 Tage, SAUERBIER, 1959) durchgeführt, damit die am Ende der Behandlungszeit untersuchten Erythrocyten theoretisch alle während ihrer Entstehung durch das jeweilige Cytostatikum beeinflußt worden waren.

Wie schon erwähnt, wurden zwei verschiedene chemotherapeutische Substanzen gewählt. Azathioprin (Rec. INN¹, IMUREK^R) gehört zur Gruppe der Antimetaboliten, das Zytostatikum 4828 (Trophosphamid = Rec. INN) zählt zu den mutagen wirkenden N - Lostderivaten.

2) Azathioprin (IMUREK^R)

Azathioprin ist 6 - (1 - Methyl - 4 - nitro - imidazol - 5 - ylthio -) - purin, ein Derivat des 6- Mercaptopurins. Es wurde von HITCHINGS und Mitarbeitern in den Wellcome Research Laboratorien entwickelt und hat folgende chemische Struktur:



¹ Recommended International Non - Proprietary Name

Die pharmakologischen Wirkungen von Azathioprin entsprechen qualitativ denjenigen von 6 - Mercaptopurin (6 - MP). Stoffwechselversuche ergaben, daß Azathioprin in vivo fast vollständig in 6 - Mercaptopurin umgesetzt wird. Das 6 - Mercaptopurin greift in die Nucleinsäuresynthese ein. Seine Wirkung als Purinantagonist wurde an zwei Stämmen von *Lactobacillus casei* entdeckt (BURCHENAL et al., 1953). Es hemmt die enzymatische Umwandlung von Inosinsäure in Adenylsäure (BALIS et al., 1963) und konkurriert mit Adenin und Hypoxanthin, da es mit ihnen chemisch verwandt ist (BROWN, 1954, KUSCHINSKY et al., 1970, SALSER et al. 1965, SELIGER, 1956, SKIPPER, 1954). Auf diese Weise wird die Synthese der DNS oder der RNS oder beider Substanzen gehemmt (AISENBERG, 1965). Außer dieser genannten Wirkung konnte WILMANN (1963, 1965, 1971) eine direkte Hemmung der Tetrahydrofolsäure - Formylase durch 6 - MP zeigen.

Im Unterschied zu 6 - Mercaptopurin ist der therapeutische Index von Azathioprin größer. Es wird heute besonders zur immunsuppressiven Therapie verwendet (BLÄKER et al. 1969, GERHARTZ et al. 1967, HITZIG, 1966, KÖLLE, 1969, KUSCHINSKY et al. 1970, MICHOT, 1968). In der Behandlung der Abstoßung von Transplantaten ist Azathioprin das wichtigste Einzelmedikament (STARZL, 1964). Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen dokumentieren seine Wirksamkeit (AISENBERG, 1965, BÜCHERL et al., 1966, BURCHENAL et al., 1954, CALNE, 1961, GERHARTZ et al, 1967, HARDY et al., 1964, HITZIG, 1966, HUME et al., 1966, MERRIL, 1968, PHILIPS et al., 1953, PHILIPS et al., 1954, STARZL, 1964, STARZL et al., 1964, ZUKOSKI et al., 1963).

Als Nebenwirkungen sind Anorexie und Übelkeit bekannt geworden. Die bei Maus, Ratte, Katze und Hund beobachtete Lebertoxizität (CLARKE et al., 1953, PHILIPS et al., 1954) soll beim Menschen ebenfalls vorkommen (MC JLVANIE et al. , 1959, SHERLOCK, 1965), ist aber mit der üblichen Dosierung selten (BURCHENAL et al. 1953, BURCHENAL et al., 1954). Die Wirkung auf das Knochenmark, die für unsere

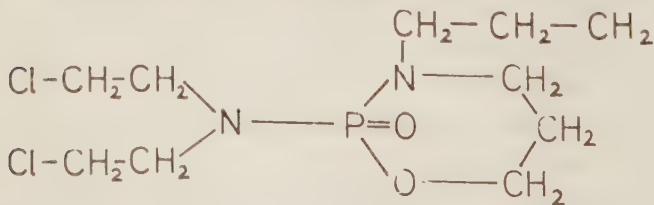
Untersuchungen von besonderer Bedeutung war, entspricht der Wirkung von 6 - Mercaptopurin. In der Literatur sind Störungen der Erythro-, Granulo- und Thrombopoese angegeben (BURCHENAL et al., 1953, DUME et al., 1970, HUME et al., 1966, STARZL, 1964). Die Einwirkungen auf das haemopoetische System lassen sich in mehrere Phasen trennen:

Als Frühreaktion zeigt das Knochenmark eine Markhyperplasie mit Überwiegen der Erythropoese. Diese Phase zeigt eine megaloblastäre Reaktion, wobei man neben den Megaloblasten auch Karyorhexis - Figuren und JOLLY - Körperchen beobachtet. In der 2. Stufe folgt die Schädigung der Granulopoese, wobei das zugunsten der Erythropoese verschobene erythroleukopoetische Verhältnis ein zuverlässiger Parameter für den beginnenden myelotoxischen Effekt ist. In der Schlußphase finden sich Reifungs- und Teilungsstörungen, die hauptsächlich die Erythropoese betreffen. Es kann zum vollkommenen Zusammenbruch der Haemato- poese kommen (DUME und PÖTTGEN, 1970, KOLLE, 1969, MICHOT, 1968).

3) Trophosphamid, Rec INN (Zytostatikum 4828)

Zytostatikum 4828 steht in seiner chemischen Struktur dem Cyclophosphamid nahe und unterscheidet sich von diesem nur durch die Einführung einer weiteren 2 - Chloräthyl - Gruppe am hexazyklischen Stickstoffatom. Die chemische Bezeichnung lautet

3 - (- 2 - chloräthyl) - 2 - bis - (2 - chloräthyl) - amino - tetrahydro - 2 H - 1,3,2 - oxazaphosphorin - 2 - oxid. Trophosphamid hat folgende Strukturformel:



Die bisherigen pharmakologischen Versuche (BROCK, 1967) zeigen gewisse Übereinstimmungen mit Cyclophosphamid (ENDOXAN^R). In vitro ist die Substanz weitgehend unwirksam, wie es auch für Cyclophosphamid von GERHARTZ (1960) gezeigt wurde. Trophosphamid besitzt gegenüber anderen Alkylantien eine größere therapeutische Breite bei Experimentaltumoren von Ratte und Maus (DRINGS et al., 1970).

Trophosphamid gehört zur Gruppe der mutagen wirkenden N - Lostderivate. Ihrem wahrscheinlichen Wirkungsmechanismus entsprechend werden diese Stoffe auch als sog. alkylierende Substanzen bezeichnet, die während der Zellteilung in die Synthese der DNS eingreifen (BAUER, 1963, SCHMIDT, 1971). Wegen der Ähnlichkeit in der Wirkung werden die Alkylantien auch Radiomimetika genannt (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1970).

Als Indikationen zur Trophosphamidtherapie dürfen im wesentlichen die gleichen wie zur Endoxan^R - Behandlung gelten: Behandlung von Systemkrankheiten und von inoperablen Karzinomen (z. T. in Kombination mit anderen Medikamenten, Bestrahlung und chirurgischen Maßnahmen) und zur Immunsuppression.

Die Nebenwirkungen sind bisher für Cyclophosphamid besser untersucht als für Trophosphamid und sollen hier ebenfalls berücksichtigt werden. Als wichtigste Reaktionen zeigen sich Gewichtsabnahme, Übelkeit, Erbrechen, Alopezie, haemorrhagische Zystitis, Leukopenie und Thrombopenie (d'AMBROSIO et al., 1964, BENJAMIN, 1963, BOCK, 1965, DRINGS et al., 1970, GERHARTZ, 1959, GERHARTZ, 1959, GERHARTZ, 1959, GERHARTZ, 1960, GROSS et al. 1958, HOST, 1966, KEUS, 1963, MEYTHALER, 1961, SCHMIDT, 1971). Das rote Blutbild kann ebenfalls beeinflußt werden. Jedoch scheint die Hemmung der Erythropoese weniger stark zu sein als die der übrigen Zellsysteme (ECKHARDT et al. 1959, FLEISCHER, 1963, GERHARTZ, 1962, GUELFI et al., 1963, HOST, 1966, KONDO, 1964, MAUSS et al., 1961, NISSEN-MEYER et al., 1960, di PIETRO, 1959, PLIESS et al., 1961).

Genauere morphologische Untersuchungen über den Wirkungsablauf an der Erythropoese wurden von BRICHTA und REIMER (1966, 1967) und von PLIESS und FASSBENDER (1961) unternommen. Die Schädigung der Zellsysteme ist dosisabhängig. Bei einer Gesamtdosis von 800 mg ENDOXAN^R, die in Tagesdosen von 6 - 10 mg / kg an Patienten mit malignen Tumoren verabreicht wurde, zeigten sich schon Zellveränderungen der Erythropoese, während die Granulopoese zu diesem Zeitpunkt noch keine Alterationen erkennen ließ. Der Höhepunkt der Erythroblastenkernveränderungen trat bei einer Gesamtdosis von 2 - 3 g auf. Megalo- und Gigantoblasten, sowie doppelkernige Erythroblasten und Zellen mit polyploiden Kernen wurden als Zeichen der Mitosehemmung bzw. Verlängerung der Mitosedauer im Knochenmark gesehen (BRICHTA et al., 1966, REIMER et al., 1967). Außerdem traten Megalocyten auf und in den Erythrocyten fanden sich HOWELL - JOLLY - Körperchen, die als Anzeichen einer Entkernungsstörung gewertet wurden. Eine befriedigende Erklärung fehlt aber bislang (BEGEMANN, 1970, BRICHTA et al., 1966, STOBBE, 1970).

Als Ursache dieser Befunde wird ein passagerer Folsäuremangel diskutiert, der sich auch auf den Fermentgehalt der Zellen auswirkt. Als zusätzliche Störungen des Kernaufbaus werden die Veränderungen der Zellgröße und -teilung aufgefaßt (BRICHTA et al., 1966, REIMER et al., 1967). Allerdings ist die Interpretation der Erythroblastenkernveränderung noch nicht lückenlos. Eine gleichzeitige Folsäuregabe konnte die Ergebnisse nicht beeinflussen, so daß eine Verwertungsstörung für Folsäure oder eine Fermentblockade bzw. eine Fermentstörung im Organismus auftreten muß (REIMER et al., 1967). Ebenfalls ungeklärt ist, weshalb sich die Reaktionen spontan zurückbilden.

Im Tierversuch zeigte Cyclophosphamid als weitere Nebenwirkung eine toxische Leberparenchymschädigung. Bei genügend langer Applikation der Cytostatika konnte eine kanzerogene Wirkung bestätigt werden (SCHMÄHL, 1967 und 1971, SCHMIDT, 1969).

4) Vorbemerkungen zum Stoffwechsel der Erythrocyten

Der reife Erythrocyt zeigt gegenüber den Zellen anderer Gewebe einige Besonderheiten in seinem Stoffwechsel und Aufbau. 95 % der Trockensubstanz werden vom Haemoglobin gestellt (FRICK). Der Rest enthält die Enzyme zur Energiegewinnung, die ausschließlich über die Glykolyse erfolgt (BEGEMANN, 1970, FRICK, 1970, LÖHR, 1964, LUNDGAARD, 1933, PRANKERD, 1961, RAPOPORT, 1965, RAPOPORT, 1966). Mit dem Kernverlust der roten Zelle und dem Verlust der Zellorganellen aus den Reticulocyten gehen Enzymsysteme für die Synthese von Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden, Kohlenhydraten, Zytocromen und Haemoglobin verloren (BEGEMANN, 1970, BISHOP et al., 1961, LÖHR, 1964, LÖHR, 1966, PRANKERD, 1961, RUBINSTEIN et al. 1956, WINTROBE, 1968). Ebenfalls verschwinden die meisten Enzyme des Trikarbonsäurezyklus und der Atmungskette (bis auf die Malatdehydrogenase und Isocitratdehydrogenase) (LÖHR, 1964). Die für die Verknüpfung von Kohlenhydrat- und Phospholipidstoffwechsel wichtigen Enzyme L - α - Glycerophosphatdehydrogenase (BARANOWSKI - Enzym) und Glycerophosphatoxydase (GREEN - Enzym) sind in reifen Erythrocyten nicht vorhanden (LÖHR et al., 1957).

Die reife rote Blutzelle hat also nur einen "Primitivstoffwechsel" (LÖHR, 1964).

Kohlenhydrate können noch bis zur Milchsäure abgebaut und dabei nur zwei energiereiche ATP - Moleküle pro Mol Glukose gewonnen werden.

Neben der Glykolyse besitzen reife Erythrocyten die Enzyme des oxydativen Glukoseabbaus über den Hexosemonophosphat - Zyklus, dessen einzelne Reaktionsstufen von HORECKER und DICKENS entschlüsselt wurden (BEGEMANN, 1970, CHAPMAN et al., 1962, DICKENS, 1938, DICKENS, 1958, DISCHE, 1951, DISCHE, 1964, GRANICK, 1949, HARRIS, 1963, HORECKER et al., 1951, HORECKER et al., 1951, LÖHR, 1964, LÖHR, 1966, MURPHY, 1960, PRANKERD, 1955, PRANKERD, 1961, RAPOPORT, 1965, RAPOPORT, 1966, WARBURG et al., 1931). Dabei wird keine Energie gewonnen, sondern neben der Pentosephosphatbildung NADPH bereitgestellt und CO_2 aus dem Glukose - 6 - phosphat freigesetzt. Die Reduktion des oxydierten Glutathions ist eng mit dem

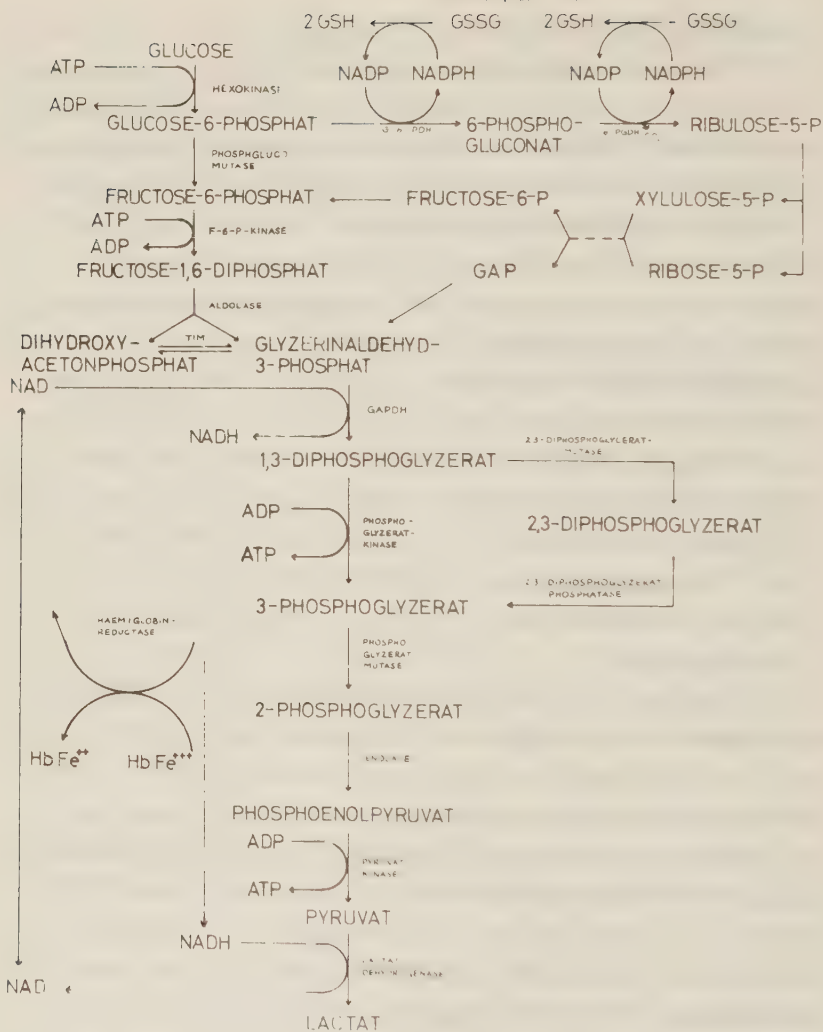


Abb. 1: Abbauege der Glucose im Erythrocyten. Glykolyse, Pentosephosphat - und 2,3 - Diphosphoglycerat - Zyklus (nach BUSCH, 1968).

Kohlenhydratstoffwechsel des Erythrocyten verbunden. Als Enzym wirkt dabei die Glutathion - Reduktase, die in der menschlichen roten Blutzelle sowohl NADH als auch NADPH spezifisch ist (BEUTLER et al., 1963, EIFLER et al., 1964, SCOTT et al., 1963). Ob es sich dabei um zwei verschiedene Enzyme handelt oder um ein Enzym, das mit beiden Cofaktoren reagiert, ist noch nicht endgültig geklärt. Für den Kaninchenerythrocyten konnte bislang nur eine NADPH - abhängige GR gefunden werden (RAPOPORT, 1967).

Dieses GSH / GSSG - System ist für die Funktion SH - gruppenabhängiger Reaktion von großer Bedeutung (SCHEUCH, 1962). Eine Schädigung des Redoxsystemes führt zu einem vorzeitigen Abbau der Erythrocyten in der Milz (JACOB et al., 1962, JACOB et al., 1962, WALLER et al., 1967), da die SH - Gruppen von Enzymen, Haemoglobin und Strukturproteinen nicht mehr gegen Oxydationsprozesse geschützt werden (WALLER et al., 1966).

Eine NADH- und eine NADPH -abhängige Methaemoglobinreduktase halten den roten Blutfarbstoff in funktionsfähigem Zustand (BEGEMANN, 1970, LÖHR, 1964, RAPOPORT, 1966).

Die Glykolyse der roten Blutzellen hat als Besonderheit noch einen Nebenweg, den sog. RAPOPORT- LUEBERING oder 2,3 - Diphosphoglycerat - Zyklus (FRICK, 1970, LÖHR, 1964, RAPOPORT, 1965, RAPOPORT, 1966, RAPOPORT et al., 1950, RAPOPORT et al., 1951, PRANKERD, 1961). Mit Hilfe einer spezifischen Diphosphoglycerat - Mutase wird 2,3 - Diphosphoglycerat gebildet, das dann durch eine Glycerat - 2,3 - Diphosphatase zu 3 - Phosphoglycerat gespalten und wieder in die Glykolyse eingeschleust wird.

100 ml Erythrocyten verbrauchen in der Stunde ca. 35 mg Glucose. Das entspricht einem täglichen Glucoseverbrauch der Gesamterythrocytenmenge von 20 g. Im Vergleich zum Verbrauch kernhaltiger Zellen beträgt der Stoffwechsel kernloser Erythrocyten nur 5 %, ist also sehr gering (BEGEMANN, 1970). Der begrenzende Schritt der Glykolyse ist dabei die Hexokinase - Reaktion (AUGUSTIN et al., 1965,

HINTERBERGER et al., 1961, RAPOPORT, 1965, RAPOPORT et al., 1961, YOSHIKAWA et al., 1968). Als direkte oder indirekte Beweise dafür gelten, daß Hexokinaseaktivitäten und Glykolyseraten verschiedener Spezies übereinstimmen, daß der Unterschied der Glykolyserate in Reticulocyten und Erythrocyten mit der Hexokinaseaktivität parallel verläuft, daß die HK die geringste Aktivität aller Glykolyseenzyme besitzt und daß die starke Mg - Abhängigkeit der Glykolyse in gleicher Weise die Hexokinase betrifft (RAPOPORT et al., 1961).

Mit der Alterung der roten Blutzelle bricht der Energiestoffwechsel an ganz bestimmten Prädilektionsstellen zusammen (LÖHR, 1964). Es altern also nicht alle Enzymproteine, sondern ein Rückgang der Aktivitäten ist nur für einige Schlüssel-fermente zu beobachten. Es handelt sich dabei besonders um die Fermente Hexokinase (BLUM, 1962, LÖHR, 1964, LÖHR et al., 1962, RAPOPORT, 1962), G - 6 - PDH (BLUM, 1962, FORNAINI et al., 1969, GRIMES, 1963, KARIG et al., 1962, LÖHR, 1964, LÖHR et al., 1962, MARKS, 1957, MARKS, 1958, MARKS et al., 1958, MARKS et al., 1958, MARKS et al., 1959) 6 - PGDH (LÖHR, 1964, MARKS, 1957, MARKS, 1958, MARKS et al., 1958, MARKS et al., 1958) und GAPDH (LÖHR et al., 1959, LÖHR et al., 1962, RAPOPORT, 1962). Bei den Enzymen Aldolase, TIM, Phosphoglyceratkinase, Enolase, Pyruvatkinase, Lactat-, Isocitrat- und Malatdehydrogenase sind die Aktivitätsverluste nur gering oder überhaupt nicht nachweisbar (BLUM, 1962). Mit den Veränderungen des Enzymgehaltes und der damit verbundenen verringerten Stoffwechselaktivität folgen charakteristische Alterungsprozesse der Zelle: das Zellvolumen wird kleiner, die osmotische und mechanische Resistenz nehmen ab. Es lassen sich Strukturveränderungen der Erythrocytenmembran und des Haemoglobinmoleküls nachweisen (BEGEMANN, 1970, BERNSTEIN, 1959).

Der Abfall der Hexokinase - und G - 6 - PDH - Aktivität ist bei den Alterungsvorgängen der wichtigste Faktor. Die Hexokinase limitiert die Glykolyse, mit der

Inaktivierung der G - 6 - PDH wird der Pentosephosphatzyklus unterbrochen. Daraus resultiert eine Störung der Ribonucleotidsynthese mit der Folge einer Abnahme der NAD-, NADP - und Adenylsäurekonzentrationen in den Zellen (LÖHR et al., 1959). Neben dem direkten schädigenden Einfluß des ATP - Mangels auf die Zellstruktur (LÖHR, 1964) fehlen die wichtigen SH - gruppen-stabilisierenden Reaktionen. Es kommt zu den oben genannten Zellveränderungen und so zum Abbau der roten Blutzellen in der Milz.

Der gesamte Energiestoffwechsel des Erythrocyten steht im Dienste folgender Funktionen:

1. Aufrechterhaltung der Zellstruktur
2. Erhaltung des Funktionszustandes des Haemoglobins
3. Aufrechterhaltung der spezifischen Zusammensetzung der organischen Bestandteile
4. Aufrechterhaltung der Konzentrationsunterschiede der Kationen zwischen dem Zellinneren und -äußeren (RAPOPORT, 1966).

Diesen Aufgaben ist das energieliefernde System des Erythrocyten angepaßt. Nach FRICK (1961) kann die rote Zelle als Beispiel biologischer Zweckmäßigkeit angesehen werden.

Mit der Einführung der enzymatischen Bestimmungsmethoden in die Haematologie konnten die Pathogenese einiger Bluterkrankungen aufgeklärt und die Diagnosestellung verbessert werden. So sind Störungen der Enzymfunktionen für haemolytische Anaemien, sideroachrestische Anaemien und Methaemoglobinanaemien aufgedeckt worden, deren Ursachen bis dahin nicht bekannt waren. Ja sogar klinisch gesunde, heterozygote Merkmalsträger konnten erkannt werden. Für haemolytische Anaemien wurden bisher Mangel der G - 6 - PDH (BEUTLER, 1967, BEUTLER et al., 1954, BEUTLER et al., 1954, BEUTLER et al., 1955, BEUTLER et al., 1955, BLUM, 1962, CARSON et al., 1956, DERN et al., 1954, DERN et al., 1955, FORNAINI et al., 1964, LÖHR, 1964, LÖHR et al., 1961, LÖHR et al., 1963, LÖHR et al., 1966, WALLER et al., 1957, WALLER et al., 1963) der 6 - PGDH (LÖHR, 1964, LÖHR et al., 1964), der Hexokinase (VALENTINE et al., 1967), der Pyruvatkinase

(BUSCH, 1964, BUSCH, 1964, BUSCH, 1964, BUSCH et al., 1965, FRICK, 1964, GIRIMES et al., 1964, JACOBASCH, 1965, KEITT, 1966, TANAKA et al., 1961, TANAKA et al., 1962, VALENTINE et al., 1961, WALLER et al., 1964), der 2,3 - Diphosphoglycerat - Mutase (PRANKERD, 1960, WALLER et al., 1963), der Triosephosphat - Isomerase (SCHNEIDER et al., 1965, SCHNEIDER et al., 1967, VALENTINE et al., 1966), der Glutathion - Reductase (BLUM, 1962, CARSON et al., 1961, LÖHR, 1964, LÖHR et al., 1962, WALLER, 1967, WALLER et al., 1965) und der Adenylatkinase (BUSCH, 1970, SZEINBERG et al., 1969) gefunden.

B. METHODIK

1) Verwendete Lösungen und Substanzen

Digitonin, kristallisiert (MG 1229, 34),

EDTA (im Handel als Titriplex III : Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure mit 2 H₂O, MG 372,24),

D-Glucose (MG 180,16),

Kaliumchlorid p.a. (MG 74,56),

Magnesiumsulfat (Mg SO₄ x 7 H₂O p.a., MG 246,48),

Natriumchlorid p.a. (MG 58,44),

Natriumfluorid p.a. (MG 41,99),

Perchlorsäure p.a. (MG 100,46)

(alle Firma E. Merck, Darmstadt)

Humanalbumin (trocken, "reinst", elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 %)

(Behring - Werke Marburg/Lahn).

Alle übrigen Substanzen wurden von der Firma Boehringer Mannheim geliefert. Als Lösungen (Substrate) bzw. Verdünnungen (Enzymsuspensionen) sind sie bei + 4° C in der Regel 14 Tage haltbar.

TRA-Puffer: eingestellt auf pH 7,5 (pH - Meter der Firma Metrohm AG, Herisau (Schweiz), Eichlösung "Puffertitrisol" der Firma E. Merck, Darmstadt), in braunen Flaschen bei + 4° C in der Regel zwei Monate haltbar. (TRA= Triäthanol - Hydrochlorid, krist.) TRA/1 - Puffer dient zur Haemolyse und enthält TRA 50 mM und EDTA 5 mM. Die einzelnen Puffer für die optischen Tests sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Konzentrationen und Zusammensetzungen der Pufferlösungen in den Testansätzen

Puffer:	TRA:	EDTA:	Mg SO ₄ :	KCl:
TRA/2	50 mM	5 mM	-	-
TRA/3	50 mM	5 mM	8 mM	-
TRA/4	50 mM	5 mM	8 mM	75 mM
TRA/4 S	50 mM	-	8 mM	75 mM

Modifizierte GOWERS sche Lösung: Wasserfreies Natriumsulfat 138,0, 100 %ige Essigsäure p.a. 875,8 und Aqua dest. ad 5 l. In ihr sind fein verteilte Erythrocyten tagelang haltbar.

Gesättigte Digitoninlösung: 1 g Digitonin in 100 ml Aq. dest. geben und Niederschlag abfiltrieren.

5,4 %ige Perchlorsäure: 7,8 ml 70%ige Perchlorsäure p.a. auf 100 ml mit Aq. dest. angefüllt.

3,8 %ige Natriumcitratlösung: 3,8 g Trinatriumcitrat - 5,5 - hydrat in 100 ml Aq. bidest. lösen.

Physiologische Kochsalzlösung: 9 g Natriumchlorid p. a. in 1000 ml Aq. bidest. lösen.

PHARMAKA:

Trophosphamid (Zytostatikum 4828) wurde von den ASTA - Werken, Brackwede in Ampullen zu 200 mg/ 2 ml (Charge 527) zur Verfügung gestellt. Der Inhalt der Ampullen wurde mit Aqua bidest. so verdünnt, daß die Konzentration 10 mg/ml bzw. 20 mg/ml betrug.

Azathioprin (IMUREK^R) wurde von Burroughs Wellcome u. Co., London als Reinsubstanz überlassen. Es wurde in Aq. dest. durch ca. 30 minütiges Rühren mit dem Magnetrührer homogen aufgeschwemmt, so daß 1 ml 10 mg Azathioprin enthielt.

2) Gewinnung von Erythrocyten und Herstellung eines zellfreien Haemolysats

Aus der Ohrvene der Kaninchen wurden 4,5 ml Blut in ein graduiertes Zentrifugenglas mit 0,5 ml 3,8 %iger Natriumcitratlösung entnommen. Die Hälfte dieses Citratblutes wurde nach LÖHR und WALLER (1962) zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (der Überstand mit den weißen Blutzellen wurde abgesaugt), dann in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert (Erythrocytenkonzentration etwa $2 \times 10^6 / \text{mm}^3$). Zur Haemolyse wurden 1 Volumenteil der Zellsuspension mit 1 Volumenteil Aq. bidest., 0,7 Volumenteile TRA / 1 - Puffer und 0,3 Volumenteile gesättigter Digitoninlösung gemischt, nach 15 min bei $+4^\circ \text{C}$ wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert.

3) Bestimmung der Enzymaktivitäten

a) Prinzip des UV - Tests

Die Enzymaktivitäten wurden im einfachen oder zusammengesetzten optischen Test von O. WARBURG und Mitarb. (1935) bestimmt. Als Grundlage dieser Tests diente die Lichtabsorption der hydrierten Coenzyme Nicotinamidadenindinucleotid und Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NAD und NADP, früher als DPN und TPN bezeichnet), die 1935 erstmals bei der Untersuchung des Zwischenferments angewandt wurde (NEGELEIN et al., 1935). Bei den gekoppelten Reaktionen hat der NAD - oder NADP - abhängige Schritt die Funktion einer Indikatorreaktion.

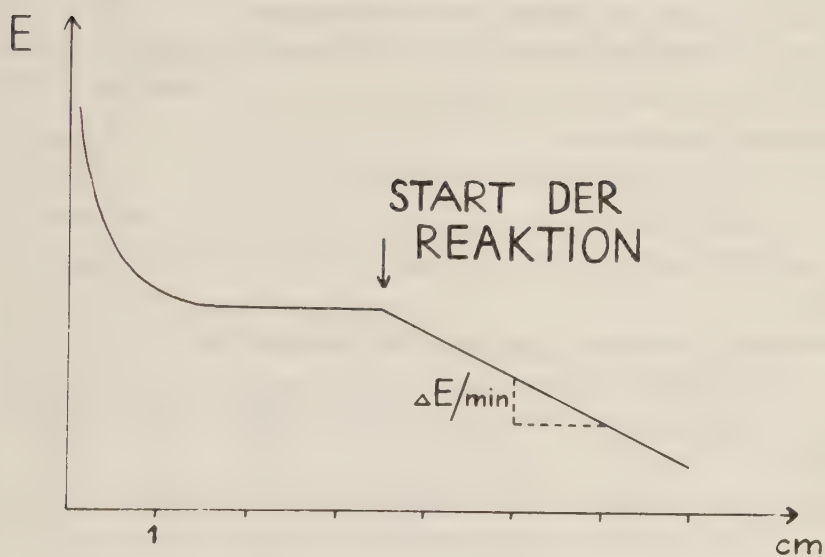


Abb. 2: (Modifiziert nach BERGMEYER, 1962). Angenommen sei ein Papiervor-
schub von 1 cm/min.

Mögliche Nebenreaktionen werden durch einen Vorlauf vor den einzelnen Tests zum Stillstand kommen gelassen. Dann wird die durch das gesuchte Enzym katalysierte Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet.

Während der Reaktion werden Pyridinnukleotide hydriert (oder dehydriert) und erhöhen (oder vermindern) die Absorption ultravioletten Lichts.

Zur Ermittlung der Enzymaktivitäten werden mit einem Photometer Extinktionsmessungen vorgenommen und aus den aufgezeichneten Kurven die Extinktionsänderung pro Minute berechnet.

Ein schematisches Schaubild verdeutlicht das Vorgehen (s. Abb. 2).

b) Messung der einzelnen Enzymaktivitäten

Im stromafreien Haemolysat (s. S. 13) wurden die Aktivitäten folgender Enzyme bestimmt:

Hexokinase (= Glukokinase, HK) nach GRIGNANI und LÖHR, 1960,

Glucose - 6 - Phosphat - Dehydrogenase (G - 6 - PDH) nach LÖHR und WALLER, 1962,

6 - Phosphogluconat - Dehydrogenase (6 - PGDH) nach HORECKER und SMYRNIOTIS, 1955,

NADPH - abhängige Glutathion - Reduktase (GR) nach RACKER, 1955,

Fructose - 1,6 - Diphosphat - Aldolase (FDA) nach DELBRÜCK et al., 1959,

Triosephosphat - Isomerase (TIM) nach DELBRÜCK et al., 1959,

Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase (GAPDH) nach DELBRÜCK et al., 1959,

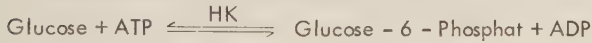
Phosphoglyceromutase (PGM) nach VOGELL et al., 1959,

Pyruvatkinase (PK) nach BEISENHERZ et al., 1953.

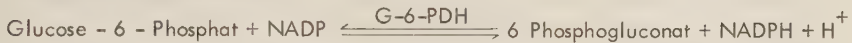
Die Extinktionsmessungen zur Ermittlung der Enzymaktivitäten erfolgten mit einem Photometer Eppendorf (Firma Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) in einer thermokonstanten Küvette (+ 25°C). Als Leerwert wurde Aq. bidest. verwendet. Nach dem Einpipettieren der Lösungen in der in Tabelle 1 aufgeführten Reihenfolge

wird der Küvetteninhalt 5 min lang auf 25° C erwärmt. Nach dem Start der Reaktion mit der jeweils zuletzt genannten Substanz wird die Extinktion 10 min lang (bei der HK 30 min) mittels einer Transformationsstufe (1853 Eppendorf) linearisiert und von einem Kompensationsschreiber (Eppendorf 4410) aufgezeichnet. Dieses Verfahren erlaubt eine Dokumentation der Messungen. Im Prinzip katalysieren die gemessenen Enzyme im optischen Test folgende Reaktionen (s. Abb. 1):

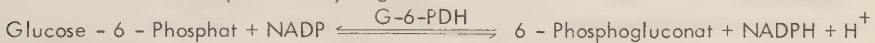
1. Hexokinase:



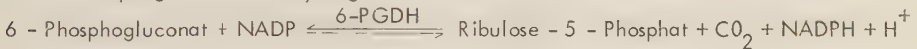
Als Indikatorreaktion dient:



2. Glucose - 6 - Phosphat - Dehydrogenase:



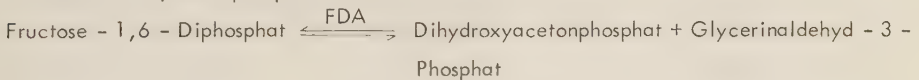
3. 6 - Phosphogluconat - Dehydrogenase:



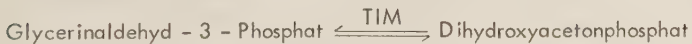
4. NADPH - abhängige Glutathion - Reduktase:



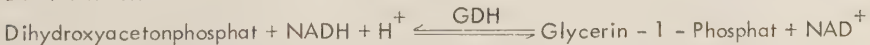
5. Fructose - 1,6 - Diphosphat - Aldolase:



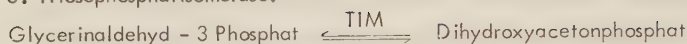
Als Hilfsreaktion dient:



Die Indikatorreaktion ist:



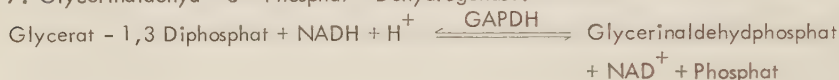
6. Triosephosphatisomerase:



Als Indikatorreaktion dient:



7. Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase:



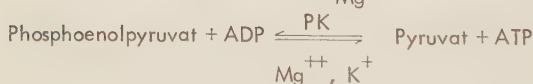
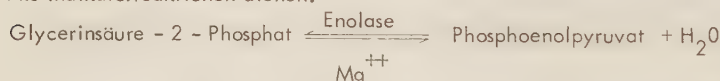
Die folgende Reaktion stellt das nicht im Handel befindliche Glycerat - 1,3 - Diphosphat zur Verfügung:



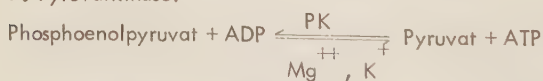
8. Phosphoglyceromutase:



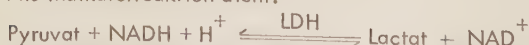
Als Indikatorreaktionen dienen:



9. Pyruvatkinase:



Als Indikatorreaktion dient:



Die in den Testreaktionen der HK, G - 6 - PDH und 6 - PGDH reduzierten Pyridinnukleotide, gemessen an der Absorption bei 334 nm, bzw. die in den übrigen Testansätzen oxydierten Pyridinnukleotide, gemessen an der Absorption bei 366 nm, sind ein Maß

Tab. 2: Zusammensetzung der einzelnen Testansätze:

Test:	Substanzen:	Konzentrationen:	Volumina:
HK	TRA/3	s. S. 12	1,50 ml
	G-6-PDH	1,4 U/3 ml	0,05 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
	Glukose	2,0 mM	0,06 ml
	NADP ⁺	0,5 mM	0,05 ml
	NaF	2,0 mM	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,20 ml
	ATP	1,5 mM	0,05 ml
G-6-PDH	TRA/2	s. S. 12	1,50 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
	NADP ⁺	0,50 mM	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,35 ml
	Glucose-6-Phosphat	0,66 mM	0,05 ml
6-PGDH	TRA/3	s. S. 12	1,50 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
	NADP ⁺	0,50 mM	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,34 ml
	6-PG	0,83 mM	0,06 ml
GR	TRA/2	s. S. 12	1,50 ml
	Albumin	0,6 mg/ml	0,20 ml
	GSSG	6,6 mM	0,20 ml
	NADPH	0,4 mM	0,10 ml
	Aq. bidest.	-	0,95 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
FDA	TRA/2	s. S. 12	1,50 ml
	FDP	4,00 mM	0,05 ml
	TIM	2,20 U/ml	0,05 ml
	GDH	2,40 U/ml	0,03 ml
	NADH	0,22 mM	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,30 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml

Test:	Substanzen:	Konzentrationen:	Volumina:
TIM	TRA/2	s. S. 12	1,50 ml
	GAP	1,50 mM	0,15 ml
	GDH	2,40 U/ml	0,03 ml
	NADH	0,22 mM	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,20 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
GAPDH	TRA/2	s.S. 12	1,50 ml
	Mg SO ₄	3,30 mM	0,05 ml
	ATP	1,50 mM	0,05 ml
	Glycerinsäure-3-Phosphat	7,00 mM	0,05 ml
	NADH	0,22 mM	0,05 ml
	GSH	2,40 mM	0,05 ml
	PGK	4,00 U/ml	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,15 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
PGM	TRA/4	s. S. 12	1,50 ml
	ADP	1,50 mM	0,05 ml
	NADH	0,22 mM	0,05 ml
	G-2,3-P	0,50 mM	0,05 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
	Enolase	0,90 U/ml	0,05 ml
	LDH	12,00 U/ml	0,10 ml
	PK	2,00 U/ml	0,10 ml
	Aq. bidest.	-	1,00 ml
	G-3-P	7,00 mM	0,05 ml
PK	TRA/4S	s. S. 12	1,50 ml
	Haemolysat	-	0,05 ml
	NADH	0,22 mM	0,05 ml
	PEP	0,80 mM	0,05 ml
	LDH	6,00 U/ml	0,05 ml
	Aq. bidest.	-	1,25 ml
	ADP	1,50 mM	0,05 ml

für die Aktivität der Enzyme.

Über die genaue Zusammensetzung der Testansätze gibt Tabelle 2 Auskunft.

c) Berechnung der Enzymaktivitäten

Im einfachen oder zusammengesetzten optischen Test wird pro Mol des reduzierten bzw. oxydierten Pyridinnukleotid eine stöchiometrisch gleiche Menge Substrat umgesetzt:



(geringere Absorption)

(größere Absorption)

Wie schnell sich das Gleichgewicht einstellt, d. h. wieviel Substrat in einer Zeiteinheit umgesetzt wird, ist ein Merkmal des reaktionsspezifischen Enzyms. Diese Umsatzrate ist ein Maß für die Enzymaktivität, die in internationalen Einheiten (= Units, Abk. U) angegeben wird. Eine Unit ist die Enzymaktivität, die ein Mikromol Substrat in einer Minute bei einer Temperatur von + 25°C umsetzt (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY 1965). Die Änderung der Extinktion einwelligen Lichts um 340 nm dient als photometrische Grundlage. Rechnerische Grundlage ist das LAMBERT - BEER'sche Gesetz:

$$\log i_0/i = E = \epsilon \times c \times d$$

Dabei bedeuten i_0 die Intensität des eingestrahnten Lichtes, i die Intensität des aus der Meßküvette austretenden Lichtes, E die Extinktion, ϵ der molare Extinktionskoeffizient mit der Dimension cm^2/Mol (für NADH und NADPH beträgt er für 334 nm $6,09 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ und für 366 nm $3,30 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$), c die Konzentration des lichtabsorbierenden Stoffes und d die Dicke der durchstrahlten Schicht.

Aus diesem Gesetz leiten sich die Berechnungen der Enzymaktivitäten ab (Einzelheiten bei BÜCHER et al., 1964). Wenn E bei 334 nm gemessen wird, ist

$$c = \frac{E}{6,09 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ min}} \quad (2)$$

$$c = \frac{\Delta E}{6,09 \times \text{cm}^3} \times 10^{-6} \frac{\text{Mol}}{\text{min}}$$

$$= \frac{\Delta E}{6,09 \times \text{ml}} \times \frac{\text{Mol}}{\text{min}} \quad (3)$$

Da die Aktivität mit der Konzentrationsänderung pro Minute definiert ist und $U = \text{Mol/min}$ ist, beträgt die Aktivität in 1 ml des Testansatzes:

$$\frac{\Delta E}{6,09} U$$

In 1 ml des Haemolysates beträgt die

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times F_1}{6,09} U$$

$$F_1 = \frac{\text{Gesamtvolumen des Testansatzes}}{\text{Volumen des hinzugegebenen Haemolysates}}$$

In 1 ml der Zellsuspension beträgt die

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times F_1 \times F_2}{6,09} U$$

$$F_2 = \frac{\text{Gesamtvolumen des Haemolysates}}{\text{Volumen der haemolysierten Zellsuspension}}$$

Die Enzymaktivitäten wurden bezogen auf:

10^{11} Zellen:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times F_1 \times F_2 \times F_3}{6,09} U / 10^{11} \text{ Zellen}$$

$$F_3 = \frac{10^{11}}{\text{Zellzahl / mm}^3} \cdot \frac{100}{\text{Zellzahl in Mio}}$$

1 g Haemoglobin:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times F_1 \times F_2 \times F_4}{6,09} \text{ U / g Hb}$$

$$F_4 = \frac{100}{\text{Haemoglobingehalt in g \%}}$$

1 ml Zellbrei:

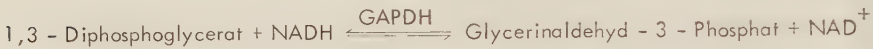
$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times F_1 \times F_2 \times F_5}{6,09} \text{ U / ml Zellbrei}$$

$$F_5 = \frac{100}{\text{Haematokritwert in \%}}$$

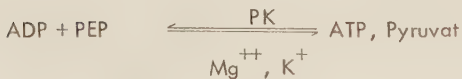
4) Messung des Adenosinphosphatgehaltes

Die Gehaltsbestimmungen an Adenosinnukleotidphosphaten erfolgen mit Hilfe dieser vollständig ablaufenden Reaktion:

1. Gehalt an ATP



2. Die Messungen der Gehalte an ADP und AMP können kombiniert werden, da in beiden Bestimmungen die zweite und dritte Reaktion dieselben sind:



Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung ist die sog. Endwertmethode (BERG - MEYER, 1962). Dabei wird das Substrat vollständig umgesetzt und mit Hilfe von gekoppelten Reaktionen eine charakteristische Extinktionsänderung herbeigeführt. Nach Beendigung der Reaktion konnte evtl. eine weitere konstante Extinktions- zu - oder - abnahme beobachtet werden, eine sog. "Schleichreaktion" (BERGMEYER, 1962). Diese Extinktionsänderung überlagerte die gesamte Reaktion und wurde bei der Auswertung durch graphische Extrapolation auf den Startpunkt der Reaktion eliminiert (s. Abb. 3).

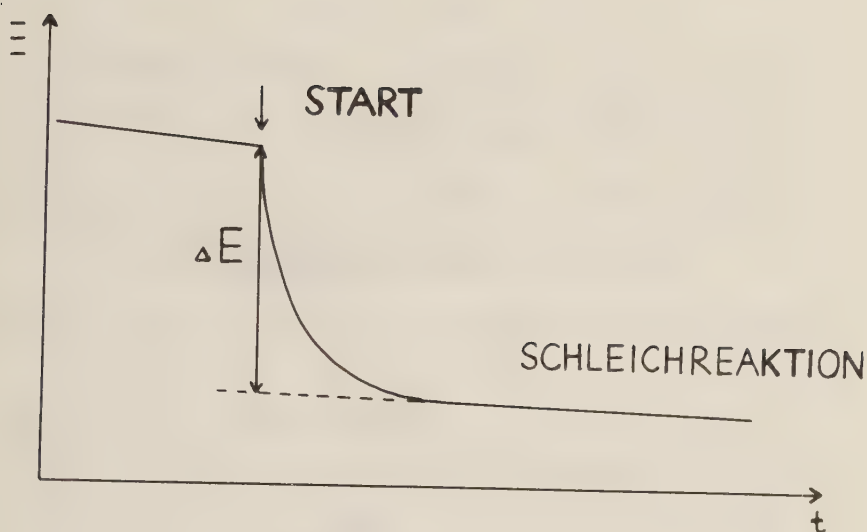


Abb. 3: Endwert - Methode, Graphische Auswertung;

(modifiziert nach BERGMAYER, 1962).

Die Berechnung der Gehalte an Adeninnukleotidphosphaten folgt dem gleichen Prinzip wie die Enzymbestimmungen. Da es sich um Endwertbestimmungen handelt, sind in 1 ml des Testansatzes gemäß Gleichung (3) enthalten:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times \frac{\mu \text{ Mol}}{\text{ml}}$$

Bei der Berechnung des ATP - Gehaltes ergibt sich für 1 ml des Überstandes:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times F_a \quad F_a = \frac{\text{Küvettenvolumen}}{\text{Filtratvolumen}}$$

In 1 ml Blut sind enthalten:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times F_a \times F_b \quad F_b = \frac{\text{Vol. der entweißten Suspension}}{\text{Vol. des entnommenen Blutes}}$$

Bezogen auf 10^{11} Zellen sind enthalten:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times F_a \times F_b \times F_3 \quad F_3 = \frac{100}{\text{Zellzahl in Millionen}}$$

Bezogen auf 1 ml Zellbrei sind enthalten:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times F_a \times F_b \times F_5 \quad F_5 = \frac{100}{\text{Haematokrit in \%}}$$

Bezogen auf 1 g Haemoglobin sind enthalten:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon} \times F_a \times F_b \times F_4 \quad F_4 = \frac{100}{\text{Haemoglobingehalt in \%}}$$

Bei der Berechnung des ADP - Gehaltes sind Faktoren F_a , F_b , F_3 , F_4 und F_5 dieselben wie bei der Berechnung des ATP - Gehaltes. Hinzu kommt folgender Verdünnungsfaktor zwischen F_a und F_b :

$$F_v = \frac{\text{Volumen des Filtrates (= Überstand + Lösung 1)}}{\text{Volumen des Überstandes}}$$

Bei der Berechnung des AMP - Gehaltes kommt zu den Faktoren der Berechnung des ADP - Gehaltes folgender Faktor von E hinzu, weil pro Mol AMP 2 Mol NADH oxydiert werden:

$$F_{\text{NADH}} = \frac{1}{2}$$

5) Weitere Bestimmungsmethoden

Die Erythrocytenzahl / μl wurde in Doppelbestimmung mit dem Hellige Erymat (Typ ER - 71) gemessen. Als Suspensionsflüssigkeit für das Blut diente GOWERS'sche Lösung im Verhältnis 1 : 2000. Diese Bestimmung der Erythrocytenzahl mit dem Zählautomaten hat wesentliche Vorteile, da die Kammerzählmethode nur "orientierende Werte" (von KLEIN-WISENBERG et al., 1968) ergibt.

Die Leukocyten wurden mit der Zählkammer nach Zeiss - Thoma doppelt bestimmt. Das Blut dazu wurde direkt vom Kaninchenohr entnommen und mit 3 %iger Essigsäurelösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

Das Differentialblutbild in Ausstrichen, die panoptisch nach PAPPENHEIM gefärbt wurden, bestimmt. Beim Kaninchen stellen sich die neutrophilen Granulocyten nach dieser Färbemethode als sogenannte pseudoeosinophile Granulocyten dar (HOFFMANN, 1956, LAWKOWICZ et al., 1966).

Die Thrombocyten wurden nach der Methode von FEISSLY - LÜDIN gezählt (MÜLLER-SEIFERT et al., 1966).

Zur Reticulocytenzählung wurde Blut im Verhältnis 1 : 1 mit Brillantkresylblau (1 %ig in physiologischer Kochsalzlösung) gemischt und nach 20 min ein Ausstrich angefertigt. 1000 Erythrocyten wurden ausgezählt und die gefundenen Reticulocyten in ‰ angegeben.

Haemoglobin wurde in Citratblut, in der Erythrocytensuspension und im Haemolysat als Haemiglobincyamid (BETKE et al., 1950, DRABKIN et al., 1932, von KLEIN-WISENBERG et al, 1968, LEGOWSKI et al., 1962, REMMER, 1956, REMMER, 1960, STADIE, 1920) jeweils in Doppelbestimmungen gemessen. Dazu wurde Cyan-

haemiglobin – Reagenz S der Firma Asid – Institut GmbH, München – Lohof benutzt. Die eingesetzte Probe wurde im Verhältnis 1 : 251 mit der Transformationslösung versetzt, und die Extrinktion konnte nach 5 min bei 546 nm gemessen werden.

Zur Haematokritbestimmung (Doppelbestimmung) wurde die Methode von STRUMIA et al. (1954) angewendet. Dünnwandige, heparinisierte Glaskapillaren (Länge 75 mm, Durchmesser 1,3 – 1,4 mm) wurden zu 3/4 mit Blut gefüllt und das blutfreie Ende der Kapillare über dem Bunsenbrenner zugeschmolzen. Nach 5 minütigem Zentrifugieren auf der Mikrohaematokritzentrifuge (Hawksley, England) wurde der Haematokrit mit dem Ablesegerät der gleichen Firma bestimmt.

Das mittlere corpusculäre Volumen (MCV) wurde errechnet aus

$$\frac{\text{Haematokrit (\%)} \cdot 10}{\text{Erythrocytenzahl (Mill/mm}^3\text{)}}$$

MCHC = mittlere corpusculäre Haemoglobinkonzentration wurde nach der Formel

$$\frac{\text{Haemoglobin (g\%)} \cdot 100}{\text{Haematokrit (\%)}}$$

ermittelt.

Der Haemoglobingehalt des Einzelerythrocyten (Hb_E) betrug

$$\frac{\text{Haemoglobin (g\%)} \cdot 10}{\text{Erythrocytenzahl (Mill/mm}^3\text{)}}$$

6) Versuchsanordnung und -durchführung

18 mischrassige Kaninchen (6 männliche, 12 weibliche Tiere) von etwa gleichem Alter (7 – 10 Monate) und gleichem Gewicht (ca. 2,5 kg) wurden durch zufällige Zuweisung in 6 Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt. Für diese Gruppen wurde wiederum durch Losentscheid die Behandlungsart ermittelt. Behandelt wurde täglich mit

Trophosphamid in Dosen zu 10 mg und 20 mg pro Kilogramm Körpergewicht und mit Azathioprin (IMUREL^R) in Dosen zu 6 mg und 12 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Trophosphamid wurde intraperitoneal verabreicht, Azathioprin erhielten die Tiere durch eine Plastiksonde in den Schlund. Für diese beiden Applikationsformen wurde je eine Placebogruppe mit untersucht, die das entsprechende Volumen physiologische Kochsalzlösung i. p. bzw. Leitungswasser mit der Schlundsonde erhielten. Die Behandlungsdauer erstreckte sich über 68 Tage, um den Zeitraum einer gesamten Erythrocytenlebensdauer des Kaninchens (SAUERBIER, 1959) zu erfassen. In diesen 68 Tagen erhielten die Tiere die Medikamente und Placebos täglich etwa zur gleichen Uhrzeit.

In zwei Leerwerten vor Beginn der Behandlung wurden Erythrocytenzahl, Reticulocyten, Leukocytenzahl, Thrombocytenzahl, Haemoglobingehalt, Haematokrit, Differentialblutbild, MCV, MCHC, Hb_E , ATP, ADP, AMP und der Quotient aus ATP/ADP im Vollblut und die Enzymaktivitäten der Hexokinase (HK), Glucose - 6 - phosphat - Dehydrogenase (G - 6 - PDH), 6 - Phosphogluconat - Dehydrogenase (6 - PGDH), Pyruvatkinase (PK), Glutathion - Reduktase (GR), Phosphoglycerat - Mutase (PGM), Triosephosphat - Isomerase (TIM), Fructose - 1,6 - diphosphat - Aldolase (FDA) in den Erythrocyten bestimmt. Aus versuchs-technischen Gründen wurde die Behandlung gestaffelt durchgeführt: an aufeinanderfolgenden Tagen wurde damit begonnen, jeweils 2 Tiere zu behandeln, bis alle 18 Kaninchen im Versuch waren. Die Kombination dieser beiden Tiere wurde dabei so gewählt, daß an einem Tag 2 Kaninchen mit verschiedenen Behandlungsarten (z. B. Kaninchen 1 : 20 mg/kg KG Trophosphamid, Kaninchen 2: Placebo 0,9 %ige NaCl Lösung i.p., Kaninchen 3: 10 mg/kg KG Trophosphamid, Kaninchen 4 : 12 mg/kg KG Azathioprin etc) untersucht wurden und daß diese Kombinationen sich nicht wiederholten.

Während der Behandlung wurden nach 17, 34, 51 und 68 Tagen alle Werte gemessen, die auch für die Leeruntersuchungen ermittelt worden waren.

Die Kaninchen wurden während der Zeit des Versuches in einem klimatisierten Tierstall gehalten. Sie wurden mit Mischfutter L für Kaninchen der Hauna - Kraftfutterwerke Hünfeld / Hessen ernährt und erhielten Leitungswasser nach Bedarf. Das Gewicht wurde alle 3 Tage kontrolliert und die Gesamtdosis der Medikamente falls erforderlich korrigiert. Die Herstellung der Lösungen von Trophosphamid und der Suspension von Azathioprin ist unter B. 1. beschrieben.

7) Statistische Auswertung

Um zu entscheiden, ob die gefundenen Veränderungen der Versuchswerte rein zufällig oder durch den Einfluß der Behandlung entstanden waren, mußten statistische Untersuchungsmethoden angewendet werden. Mit ihrer Hilfe sollten die beobachteten Mittelwerte und die Versuchsstreuung analysiert werden.

Ausgangspunkt war die sog. Nullhypothese, die alle Veränderungen der Mittelwerte innerhalb der Versuchsstreuung annahm. Mit Hilfe einer Varianzanalyse wurde die Varianz innerhalb der gesamten untersuchten Gruppe mit der Varianz zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen verglichen (F - Test). War der errechnete F - Wert größer als ein dem Versuchswert entsprechender Tabellenwert (Documenta Geigy, Wiss. Tab., 6. Aufl. 1960, Seite 40 - 41), so war die Wahrscheinlichkeit für rein zufällige Unterschiede der Mittelwerte als sehr klein anzusehen; der Unterschied wurde als "signifikant" bezeichnet. Der F - Wert für das gewählte Signifikanzniveau wurde aus den o. a. Tabellen abgelesen. Wurde der Tabellenwert für die 5 %-Grenze überschritten, wurde der Unterschied "auffällig", bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1 % als "gesichert" bezeichnet.

Als Beispiele der Auswertung nach der partiell hierarchischen Varianzanalyse (CAVALLI-SFORZA, 1964) sind die Tabellen 3 und 4 eingefügt. Die sog. Faktoren (Einflußgrößen), deren Effekt und gegenseitige Beeinflussung mit der Varianzanalyse unabhängig voneinander beurteilt wurden, sind in der ersten Spalte aufgeführt.

Tab. 3: Varianzanalyse für Haemoglobinwerte bei 2 Dosen (6 und 12 mg/kg KG) Azathioprin und Placebo

Einflußgröße	SAQ	f	MAQ	F - Test	F	P
1 medikamentöse Behandlung	51,62	2	25,81	$MAQ_1 / MAQ_2 (1)$	15,44	0,01
2(1) Versuchstiere	10,02	6	1,67	-	-	-
3 zeitliche Änderung	38,37	5	7,67	MAQ_3 / MAQ_{Rest}	7,13	0,01
13 Wechselwirkung						
Medikamente - Zeit (Parallelität)	24,24	10	2,42	MAQ_{13} / MAQ_{Rest}	2,25	0,05
Rest	32,26	30	1,07	-	-	-
Total	156,54	53	-	-	-	-

Tab. 4: Varianzanalyse Trophosphamid gegen PGM ($\text{U} / 10^{11}$ Zellen)

Einflußgröße	SAQ	f	MAQ	F-Test	F	P
1 medikamentöse Behandlung	90,85	2	45,42	$\text{MAQ}_1 / \text{MAQ}_2 (1)$	0,64	-
20) Versuchstiere	419,76	6	69,96	-	-	-
3 zeitliche Änderung	26,10	3	8,70	$\text{MAQ}_3 / \text{MAQ}_{\text{Rest}}$	0,26	-
13 Wechselwirkung						
Medikamente - Zeit	200,25	6	33,37	$\text{MAQ}_{13} / \text{MAQ}_{\text{Rest}}$	1,00	-
Rest	596,91	18	33,16	-	-	-
Total	1333,89	35	-	-	-	-

Für die Auswertung mußte ein partiell hierarchisches Modell angewendet werden, weil ein Versuchstier jeweils nur eine der drei Therapieformen erhalten konnte. Damit ist der Faktor "Versuchstiere" dem Faktor "medikamentöse Behandlung" untergeordnet, was durch die Schreibweise 2 (1) symbolisiert wird.

Die Faktoren Medikamente und zeitliche Änderung sind "fixed" Faktoren, während die Versuchstiere als "random" Faktoren anzusehen sind. Auf weitere Einzelheiten soll nicht eingegangen werden, es sei hier auf die einführende statistische Literatur hingewiesen.

Die zeitliche Veränderung bezieht sich auf den gesamten Versuchsablauf. Die Wechselwirkung 13 (Medikamente - zeitliche Veränderung) gibt Auskunft über die Gleichartigkeit der zeitlichen Veränderungen bei Placebo - und zytostatischer Behandlung. Ist eine Wechselwirkung nicht nachweisbar, stimmen die zeitlichen Veränderungen bei den Medikamenten überein, d. h. die Kurven verlaufen parallel. Gesicherte Wechselwirkung zeigt dagegen Nichtparallelität.

Die Berechnung des der Versuchsanordnung entsprechenden korrekten F - Tests erfolgte nach den Regeln von Le ROY und DIXON (zit. bei DUDECK 1971). Die entsprechenden F - Werte und die zugehörigen Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in den letzten Spalten der Tabellen 3 und 4 und den Tabellen 5 bis 12 aufgeführt.

Die Ergebnisse aller Varianzanalysen sind in den Tabellen 5 bis 12 wiedergegeben. Mit dem als F_1 bezeichneten Test wird geprüft, ob eine unterschiedliche Beeinflussung durch die Art der Behandlung (Cytostatikum - hohe und niedrige Dosis, Placebo) erfolgt. Durch F_3 wird untersucht, ob die zeitlichen Veränderungen der Mittelwerte außerhalb der Versuchsstreuung liegen. F_{13} entspricht dem Test auf Wechselwirkung der Einflußgrößen 1 und 3 und ergibt damit eine Aussage ob der Verlauf der Kurven für die einzelnen Behandlungsgruppen parallel ist.

Für die statistisch auffälligen und gesicherten Versuchsgrößen wurden graphische Darstellungen der Mittelwerte angefertigt, die in den Abbildungen 4 bis 52 zusammengefaßt sind. Da der numerische Wert der Mittelwerte aus den Abbildungen

Tab. 5: Ergebnis der Varianzanalysen. F_1 untersucht den medikamentösen Einfluß, F_3 die allgemeine zeitliche Änderung und F_{13} die Parallelität der Kurven. P gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an. Die vorliegenden Werte gelten für die Versuchsgruppe Trophosphamid und Placebo i. p..

	F	P
Erythrocyten	$F_1 = 1,13$	-
	$F_3 = 3,10$	-
	$F_{13} = 2,14$	-
Reticulocyten	$F_1 = 1,20$	-
	$F_3 = 4,30$	-
	$F_{13} = 1,03$	-
Haemoglobin	$F_1 = 1,90$	-
	$F_3 = 4,93$	<0,05
	$F_{13} = 3,87$	<0,05
Haematokrit	$F_1 = 1,46$	-
	$F_3 = 0,26$	-
	$F_{13} = 3,24$	<0,05
M C V	$F_1 = 0,02$	-
	$F_3 = 3,73$	<0,05
	$F_{13} = 1,37$	-
MCHC	$F_1 = 3,81$	-
	$F_3 = 0,90$	-
	$F_{13} = 1,31$	-
Hb _E	$F_1 = 0,23$	-
	$F_3 = 1,04$	-
	$F_{13} = 0,35$	-
Leukocyten	$F_1 = 2,62$	-
	$F_3 = 0,98$	-
	$F_{13} = 0,96$	-

Fortsetzung Tab. 5

Neutroph. Granulocyten	F_1	= 2,21	-
	F_3	= 5,93	< 0,01
	F_{13}	= 0,58	-
Eosinoph. Granulocyten	F_1	= 1,64	-
	F_3	= 4,36	< 0,05
	F_{13}	= 1,46	-
Basoph. Granulocyten	F_1	= 1,00	-
	F_3	= 0,82	-
	F_{13}	= 0,72	-

Tab. 6: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Z 4828 und Placebo i.p..

F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung und F_{13} die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
Lymphocyten	$F_1 = 2,44$	-
	$F_3 = 7,00$	< 0,01
	$F_{13} = 0,99$	-
Monocyten	$F_1 = 0,07$	-
	$F_3 = 4,83$	< 0,05
	$F_{13} = 0,53$	-
Gewicht	$F_1 = 0,92$	-
	$F_3 = 17,62$	< 0,01
	$F_{13} = 1,51$	-
G-6-PDH (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 0,02$	-
	$F_3 = 0,30$	-
	$F_{13} = 2,49$	-
G-6-PDH (U/g Hb)	$F_1 = 0,18$	-
	$F_3 = 2,38$	-
	$F_{13} = 2,56$	-
G-6-PDH (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 0,32$	-
	$F_3 = 1,97$	-
	$F_{13} = 2,58$	-
6-PGDH (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 0,87$	-
	$F_3 = 4,55$	< 0,05
	$F_{13} = 2,85$	< 0,05
6-PGDH (U/g Hb)	$F_1 = 1,14$	-
	$F_3 = 2,74$	-
	$F_{13} = 1,19$	-
6-PGDH (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 1,84$	-
	$F_3 = 2,14$	-
	$F_{13} = 2,52$	-

Fortsetzung Tab. 6

	F	P
Hexokinase	$F_1 = 0,26$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 1,33$	-
	$F_{13} = 0,32$	-
Hexokinase	$F_1 = 0,19$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 0,11$	-
	$F_{13} = 0,54$	-
Hexokinase	$F_1 = 0,09$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 0,52$	-
	$F_{13} = 0,43$	-

Tab. 7: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Z 4828 und Placebo i.

F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung und die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
Pyruvatkinase	$F_1 = 1,37$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 2,28$	-
	$F_{13} = 2,14$	-
Pyruvatkinase	$F_1 = 1,81$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 1,65$	-
	$F_{13} = 3,00$	< 0,05
Pyruvatkinase	$F_1 = 1,87$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 1,03$	-
	$F_{13} = 3,24$	< 0,05
G R	$F_1 = 2,94$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 6,63$	< 0,01
	$F_{13} = 1,05$	-
G R	$F_1 = 2,07$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 3,40$	< 0,05
	$F_{13} = 0,52$	-
G R	$F_1 = 6,11$	< 0,05
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 1,28$	-
	$F_{13} = 0,04$	-
P G M	$F_1 = 0,64$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 0,26$	-
	$F_{13} = 1,00$	-
P G M	$F_1 = 2,09$	-
(U /g Hb)	$F_3 = 0,90$	-
	$F_{13} = 0,75$	-
P G M	$F_1 = 0,96$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 2,11$	-
	$F_{13} = 1,57$	-

Fortsetzung Tab. 7

	F	P
GAPDH	$F_1 = 1,91$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 0,28$	-
	$F_{13} = 1,75$	-
GAPDH	$F_1 = 0,85$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 3,10$	-
	$F_{13} = 1,31$	-
GAPDH	$F_1 = 0,47$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 6,71$	< 0,01
	$F_{13} = 2,66$	< 0,05

Tab. 8: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Trophosphamid und Placebo i.p.. F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung und F_{13} die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
T I M	$F_1 = 1,42$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 4,08$	< 0,05
	$F_{13} = 3,72$	< 0,05
T I M	$F_1 = 4,81$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 0,30$	-
	$F_{13} = 6,54$	< 0,01
T I M	$F_1 = 1,72$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 0,70$	-
	$F_{13} = 3,34$	< 0,05
F D A	$F_1 = 2,54$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 1,33$	-
	$F_{13} = 3,19$	< 0,05
F D A	$F_1 = 2,08$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 0,57$	-
	$F_{13} = 1,91$	-
F D A	$F_1 = 1,99$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 0,20$	-
	$F_{13} = 3,21$	< 0,05
A T P	$F_1 = 2,51$	-
(μ Mol/ml Blut)	$F_3 = 2,91$	-
	$F_{13} = 1,69$	-
A T P	$F_1 = 0,03$	-
(μ Mol/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 0,15$	-
	$F_{13} = 1,96$	-
A T P	$F_1 = 0,05$	-
(μ Mol/g Hb)	$F_3 = 1,04$	-
	$F_{13} = 2,50$	-
A T P	$F_1 = 0,00$	-
(μ Mol/ml Zellbrei)	$F_3 = 2,27$	-
	$F_{13} = 3,06$	< 0,05

Tab. 9: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Azathioprin und Placebo per os. F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung und F_{13} die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
Erythrocyten	$F_1 = 9,76$	$<0,05$
	$F_3 = 5,35$	$<0,01$
	$F_{13} = 1,86$	-
Reticulocyten	$F_1 = 0,03$	-
	$F_3 = 2,33$	-
	$F_{13} = 1,72$	-
Haemoglobin	$F_1 = 15,44$	$<0,01$
	$F_3 = 7,13$	$<0,01$
	$F_{13} = 2,25$	$<0,05$
Haematokrit	$F_1 = 14,70$	$<0,01$
	$F_3 = 6,77$	$<0,01$
	$F_{13} = 1,56$	-
M C V	$F_1 = 1,58$	-
	$F_3 = 2,79$	-
	$F_{13} = 1,02$	-
M C H C	$F_1 = 0,32$	-
	$F_3 = 2,26$	-
	$F_{13} = 1,86$	-
Hb _E	$F_1 = 0,46$	-
	$F_3 = 0,82$	-
	$F_{13} = 0,66$	-
Leukocyten	$F_1 = 0,78$	-
	$F_3 = 0,87$	-
	$F_{13} = 1,05$	-
Neutroph. Granulocyten	$F_1 = 0,61$	-
	$F_3 = 2,93$	$<0,05$
	$F_{13} = 0,39$	-

Fortsetzung Tab. 9

	F	P
Eosinoph. Granulocyten	$F_1 = 0,14$	-
	$F_3 = 2,17$	-
	$F_{13} = 0,49$	-
Basoph. Granulocyten	$F_1 = 0,26$	-
	$F_3 = 2,19$	-
	$F_{13} = 0,90$	-

Tab. 10: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Azathioprin und Placebo
per os. F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung
und F_{13} die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
Lymphocyten	$F_1 = 0,35$	-
	$F_3 = 2,51$	-
	$F_{13} = 0,40$	-
Monocyten	$F_1 = 0,30$	-
	$F_3 = 0,52$	-
	$F_{13} = 0,65$	-
Gewicht	$F_1 = 0,89$	-
	$F_3 = 59,97$	<0,01
	$F_{13} = 3,10$	<0,01
G-6-PDH (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 0,53$	-
	$F_3 = 4,79$	<0,01
	$F_{13} = 2,25$	<0,05
G-6-PDH (U/g Hb)	$F_1 = 0,33$	-
	$F_3 = 3,20$	<0,05
	$F_{13} = 1,46$	-
G-6-PDH (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 0,38$	-
	$F_3 = 1,98$	-
	$F_{13} = 2,20$	<0,05
6-PGDH (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 0,32$	-
	$F_3 = 2,77$	<0,05
	$F_{13} = 0,57$	-
6-PGDH (U/g Hb)	$F_1 = 0,19$	-
	$F_3 = 2,75$	<0,05
	$F_{13} = 0,50$	-
6-PGDH (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 0,22$	-
	$F_3 = 2,12$	-
	$F_{13} = 0,59$	-

Fortsetzung Tab. 10

Hexokinase	$F_1 = 3,06$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 6,66$	< 0,01
	$F_{13} = 0,96$	-
Hexokinase	$F_1 = 1,57$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 3,74$	< 0,01
	$F_{13} = 0,60$	-
Hexokinase	$F_1 = 2,19$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 3,67$	< 0,05
	$F_{13} = 0,90$	-

Tab. 11: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Azathioprin und Placebo
 per os. F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung
 und F_{13} die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
Pyruvatkinase (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 0,40$ $F_3 = 17,17$ $F_{13} = 2,09$	- <0,01 -
Pyruvatkinase (U/g Hb)	$F_1 = 0,60$ $F_3 = 16,51$ $F_{13} = 1,42$	- <0,01 -
Pyruvatkinase (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 0,80$ $F_3 = 16,25$ $F_{13} = 1,86$	- <0,01 -
GR (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 3,85$ $F_3 = 2,12$ $F_{13} = 1,66$	- - -
GR (U/g Hb)	$F_1 = 4,50$ $F_3 = 1,55$ $F_{13} = 0,91$	- - -
GR (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 3,35$ $F_3 = 1,37$ $F_{13} = 1,47$	- - -
PGM (U/10 ¹¹ Zellen)	$F_1 = 1,79$ $F_3 = 1,40$ $F_{13} = 2,25$	- - <0,05
PGM (U/g Hb)	$F_1 = 1,99$ $F_3 = 1,26$ $F_{13} = 2,35$	- - <0,05
PGM (U/ml Zellbrei)	$F_1 = 1,95$ $F_3 = 0,61$ $F_{13} = 2,42$	- - <0,05

Fortsetzung Tab. 11

	F	P
GAPDH	$F_1 = 2,87$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 1,98$	-
	$F_{13} = 1,69$	-
GAPDH	$F_1 = 1,48$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 0,67$	-
	$F_{13} = 1,62$	-
GAPDH	$F_1 = 1,43$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 1,72$	-
	$F_{13} = 1,86$	-

Tab. 12: Ergebnis der Varianzanalysen für die Versuchsgruppe Azathioprin und Placebo per os. F_1 untersucht den Einfluß der Medikamente, F_3 die zeitliche Änderung und F_{13} die Parallelität der Kurven. P = Irrtumswahrscheinlichkeit.

	F	P
T I M	$F_1 = 1,55$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 2,67$	<0,05
	$F_{13} = 1,60$	-
T I M	$F_1 = 2,04$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 4,72$	<0,01
	$F_{13} = 1,43$	-
T I M	$F_1 = 1,83$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 2,93$	-
	$F_{13} = 1,59$	-
F D A	$F_1 = 2,74$	-
(U/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 0,32$	-
	$F_{13} = 1,08$	-
F D A	$F_1 = 2,43$	-
(U/g Hb)	$F_3 = 1,60$	-
	$F_{13} = 0,88$	-
F D A	$F_1 = 2,32$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 0,68$	-
	$F_{13} = 1,19$	-
A T P	$F_1 = 0,31$	-
(μ Mol/ml Blut)	$F_3 = 3,56$	<0,05
	$F_{13} = 0,78$	-
A T P	$F_1 = 1,12$	-
(μ Mol/10 ¹¹ Zellen)	$F_3 = 0,22$	-
	$F_{13} = 1,24$	-

Fortsetzung Tab. 12

	F	P
A T P	$F_1 = 1,56$	-
($\mu\text{Mol/g Hb}$)	$F_3 = 0,39$	-
	$F_{13} = 1,20$	-
A T P	$F_1 = 0,63$	-
(U/ml Zellbrei)	$F_3 = 0,56$	-
	$F_{13} = 1,04$	-

mit hinreichender Genauigkeit entnommen werden kann, wurde auf eine zusätzliche tabellarische Darstellung dieser Werte verzichtet.

C. VERSUCHSERGEBNISSE

1) Kontrolltiere

In den Tabellen 13 bis 16 werden alle Werte der Kontrolltiere dargestellt. Zur Ermittlung dieser Mittelwerte wurden die Einzelwerte aller 6 Placebotiere (3 Tiere mit Placebo i. p. und 3 Tiere mit Placebo per os) zusammengefaßt. Am 42. Behandlungstag starb eines der Kaninchen, die physiologische Kochsalzlösung intra-peritoneal erhielten, an einer Peritonitis. Damit liegen den Mittelwerten der Bestimmungen vom 51. und 68. Behandlungstag noch 5 Einzelwerte zugrunde.

Die Zellgehalte des Blutes, die Haemoglobin- und Haematokritkonzentrationen und das Gewicht zeigen dabei eine zunehmende Tendenz, die wahrscheinlich mit dem Wachstum der Tiere während der Dauer des Versuches zu erklären ist. Die Haemoglobinbeladung des Einzelerythrocyten nimmt geringfügig ab, das mittlere corpusculäre Volumen (MCV) verhält sich gleichsinnig. Die Verschiebungen im Differentialblutbild, die insbesondere in einer Zunahme der neutrophilen Granulocyten und einer gleichzeitigen Abnahme der Lymphocyten bestehen, wurden schon von SCHERMER (1958) bei Kaninchen dieser Altersgruppe beschrieben. Die gefundenen Werte stimmen mit denen anderer Autoren weitgehend überein (ANDREW, 1965, HOFFMANN, 1956, LAWKOWICZ et al., 1966, SCHERMER, 1958).

Die untersuchten Enzymaktivitäten der Kontrolltiere nehmen alle geringfügig ab. Da bei unseren Untersuchungen keine Trennung der Erythrocyten in alte und junge Zellen (durch Bestimmung der osmotischen Resistenz oder Zentrifugation) außer der Reticulocytenzählung vorgenommen wurde, die aber nur eine geringe Zunahme ergab, kann eine genaue Erklärung dieser Veränderungen nicht gegeben werden. In bisherigen Untersuchungen am Menschen liegen unterschiedliche Er-

Tab. 13: Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Kontrolltiere (Tiere mit Placebobehandlung i.p. und per os zusammengefaßt, n = 6). Ab 51. Behandlungstag noch 5 Tiere (n = 5).

	1. Leerwert		2. Leerwert		17. Tag		34. Tag		51. Tag		68. Tag der Behandlung	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Erythrocyten ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	4,04	0,49	4,03	0,62	4,76	0,58	5,17	0,76	5,38	0,34	5,43	0,92
Reticulocyten (‰)	13,83	1,60	16,33	3,14	15,00	2,36	14,83	6,27	19,40	7,40	21,60	8,87
Haemoglobin (g%)	10,90	1,31	10,29	1,67	12,15	0,66	12,78	0,85	12,80	0,62	12,31	0,79
Haematokrit (%)	31,35	1,96	32,08	3,08	35,11	2,11	35,77	3,84	37,62	1,14	36,47	4,10
MC V (μ^3)	78,25	6,33	80,78	8,10	74,38	6,35	69,58	5,60	70,04	4,51	67,82	6,21
MCHC (%)	32,57	1,58	32,21	1,71	32,75	1,53	34,70	1,92	33,15	1,20	32,49	0,96
Hb _E (g%)	27,05	2,04	25,55	1,57	25,80	2,79	24,98	2,52	23,84	1,95	23,07	3,19
Leucocyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	8,13	3,80	7,92	3,09	9,59	5,06	9,95	3,06	8,71	4,03	8,57	3,78
Neutr. Granulocyten (%)	18,50	6,41	21,00	2,75	27,16	6,99	29,16	3,54	23,80	5,54	29,80	10,96
Eosinoph. Granulocyten (%)	0,16	0,40	2,00	3,16	0,50	0,54	0,33	0,51	0,20	0,44	0,40	0,54
Basoph. Granulocyten (%)	0,66	1,63	1,83	1,72	0,33	0,51	0,50	0,54	0,80	0,83	0,40	0,54
Lymphocyten (%)	79,66	6,21	73,83	6,33	71,66	6,97	69,00	3,94	73,80	5,89	68,40	10,71
Monocyten (%)	1,00	0,63	1,33	1,03	0,33	0,51	1,00	0,63	1,40	0,54	1,00	0,70
Gewicht (kg)	2,86	0,78	3,02	0,78	3,22	0,68	3,44	0,67	3,48	0,56	3,63	0,59

Tab. 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der Erythrocytenenzyme für alle Kontrolltiere (Tiere mit Placebobehandlung i. p. und per os zusammengefaßt, n = 6). Ab 51. Behandlungstag noch 5 Tiere (n = 5).

	1. Leerwert		2. Leerwert		17. Tag		34. Tag		51. Tag		68. Tag der Behandlung	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
G-6-PDH (U/10 ¹¹ Zellen)	23,02	7,76	21,55	3,72	20,44	6,46	16,16	3,73	19,28	2,66	17,22	3,10
G-6-PDH (U/g Hb)	8,84	1,84	9,55	1,66	9,03	1,41	7,52	1,32	8,71	0,62	8,26	0,66
G-6-PDH (U/ml Zellbrei)	3,09	0,77	2,93	0,41	2,94	0,38	2,62	0,57	2,88	0,28	2,67	0,25
6-PGDH (U/10 ¹¹ Zellen)	6,20	2,23	6,69	1,61	5,72	1,01	4,63	0,74	5,39	0,38	5,11	0,63
6-PGDH (U/g Hb)	2,37	0,54	2,96	0,73	2,57	0,28	2,16	0,25	2,46	0,36	2,48	0,28
6-PGDH (U/ml Zellbrei)	0,82	0,22	0,91	0,21	0,84	0,10	0,75	0,10	0,81	0,12	0,80	0,09
Hexokinase (U/10 ¹¹ Zellen)	1,44	0,35	1,44	0,22	1,19	0,40	1,06	0,08	1,33	0,29	0,87	0,18
Hexokinase (U/g Hb)	0,56	0,11	0,63	0,10	0,52	0,09	0,49	0,02	0,59	0,09	0,41	0,04
Hexokinase (U/ml Zellbrei)	0,19	0,03	0,19	0,02	0,16	0,02	0,16	0,00	0,19	0,03	0,13	0,01
Pyruvatkinase (U/10 ¹¹ Zellen)	15,86	3,75	15,87	2,91	11,16	4,94	7,96	1,58	9,90	1,38	9,51	1,43
Pyruvatkinase (U/g Hb)	6,51	2,28	7,04	1,32	4,87	1,23	3,73	0,71	4,50	0,63	4,58	0,39
Pyruvatkinase (U/ml Zellbrei)	2,19	0,64	2,15	0,29	1,58	0,33	1,28	0,22	1,49	0,25	1,48	0,15
G R (U/10 ¹¹ Zellen)	8,44	2,10	6,73	1,50	7,18	1,86	6,40	0,94	6,58	0,70	5,63	0,59
G R (U/g Hb)	3,28	0,54	2,98	0,66	3,20	0,49	3,02	0,50	3,00	0,42	2,73	0,35
G R (U/ml Zellbrei)	1,14	0,22	0,91	0,18	1,04	0,15	1,04	0,16	0,99	0,16	0,88	0,11

Tab. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Erythrocytenenzyme für alle Kontrolltiere (Tiere mit Placebobehandlung

i. p. und per os zusammengefaßt, n = 6). Ab 51. Behandlungstag noch 5 Tiere (n = 5).

		1. Leerwert		2. Leerwert		17. Tag		34. Tag		51. Tag		68. Tag der Behandlung	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
P G M	(U/10 ¹¹ Zellen)	21,52	11,20	18,00	2,86	17,48	6,33	13,49	2,64	16,07	2,88	13,03	1,51
P G M	(U/g Hb)	7,93	1,79	7,99	1,32	7,71	1,55	6,29	0,86	7,28	1,10	6,29	0,34
P G M	(U/ml Zellbrei)	2,83	1,07	2,36	0,39	2,51	0,44	2,18	0,37	2,40	0,33	2,03	0,09
GAPDH	(U/10 ¹¹ Zellen)	273,23	39,40	252,43	40,34	242,43	56,15	214,04	43,28	230,26	14,80	216,84	26,06
GAPDH	(U/g Hb)	109,21	23,81	111,82	16,98	108,91	18,33	99,97	16,28	105,35	14,50	105,64	17,24
GAPDH	(U/ml Zellbrei)	37,40	5,62	34,66	6,02	35,66	6,10	34,56	4,90	34,92	5,22	34,16	5,21
T I M	(U/10 ¹¹ Zellen)	1046,31	362,69	808,82	187,78	777,59	261,04	674,33	99,03	687,47	100,06	594,60	38,36
T I M	(U/g Hb)	398,07	36,34	358,68	84,16	343,18	58,26	315,52	26,27	311,84	36,61	288,86	27,13
T I M	(U/ml Zellbrei)	139,88	29,94	109,49	14,69	112,00	15,45	109,68	11,73	103,05	10,10	93,48	8,02
F D A	(U/10 ¹¹ Zellen)	4,48	1,30	4,04	0,91	3,64	1,40	2,87	0,56	3,32	0,35	2,65	0,39
F D A	(U/g Hb)	1,76	0,53	1,79	0,41	1,60	0,37	1,33	0,20	1,51	0,20	1,29	0,25
F D A	(U/ml Zellbrei)	0,60	0,16	0,55	0,12	0,52	0,11	0,46	0,06	0,50	0,05	0,41	0,07

Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Adenosinphosphate im Vollblut aller Kontrolltiere (Tiere mit Placebobehandlung i. p. und per os zusammengefaßt, n = 6). Ab 51. Behandlungstag noch 5 Tiere (n = 5).

	1. Leerwert		2. Leerwert		17. Tag		34. Tag		51. Tag		68. Tag der Behandlung	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
A T P ($\mu\text{Mol/ml Blut}$)	0,44	0,13	0,43	0,67	0,50	0,08	0,58	0,10	0,57	0,05	0,64	0,02
A T P ($\mu\text{Mol}/10^{11}$ Zellen)	11,31	3,95	11,17	2,92	10,63	1,76	11,45	2,25	10,65	1,04	12,30	2,70
A T P ($\mu\text{Mol/g Hb}$)	4,20	1,49	4,38	1,15	4,13	0,64	4,60	0,90	4,49	0,59	5,30	0,47
A T P ($\mu\text{Mol/ml Zellbrei}$)	1,42	0,40	1,39	0,28	1,42	0,19	1,68	0,37	1,52	0,19	1,80	0,25
A D P ($\mu\text{Mol/ml Blut}$)	0,12	0,02	0,10	0,01	0,09	0,01	0,09	0,01	0,09	0,01	0,10	0,01
A D P ($\mu\text{Mol}/10^{11}$ Zellen)	3,07	0,38	2,75	0,70	2,29	0,51	1,98	0,40	1,94	0,24	1,96	0,43
A D P ($\mu\text{Mol/g Hb}$)	1,16	0,08	1,08	0,29	0,85	0,11	0,79	0,15	0,81	0,10	0,85	0,14
A D P ($\mu\text{Mol/ml Zellbrei}$)	0,39	0,04	0,34	0,07	0,29	0,04	0,28	0,05	0,27	0,03	0,28	0,04
A M P ($\mu\text{Mol/ml Blut}$)	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00
A M P ($\mu\text{Mol}/10^{11}$ Zellen)	0,95	0,12	1,02	0,20	0,70	0,25	0,72	0,10	0,70	0,09	0,75	0,17
A M P ($\mu\text{Mol/g Hb}$)	0,36	0,03	0,39	0,08	0,25	0,07	0,28	0,03	0,29	0,02	0,32	0,03
A M P ($\mu\text{Mol/ml Zellbrei}$)	0,12	0,00	0,12	0,02	0,08	0,02	0,10	0,00	0,09	0,00	0,10	0,01
ATP/ADP (ml Blut)	3,49	0,34	4,12	0,57	4,88	0,89	5,99	1,27	5,76	0,65	6,52	0,89
ATP/ADP (10^{11} Zellen)	3,38	0,27	4,08	0,61	4,81	0,90	5,93	1,27	5,50	0,55	6,33	0,86
ATP/ADP (g Hb)	3,39	0,28	4,08	0,59	4,83	0,90	5,93	1,27	5,54	0,57	6,34	0,85
ATP/ADP (ml Zellbrei)	3,39	0,28	4,09	0,60	4,83	0,86	6,03	1,29	5,55	0,61	6,37	0,84

gebnisse der Enzymaktivitätsänderung mit dem Lebensalter vor. JONES und McCANCE (1949, 1949) beschrieben geringere Enzymaktivitäten der Cholinesterase, Karboanhydrase, Katalase und Glyoxalase des Erythrocyten beim Kinde als beim Erwachsenen. Spätere Untersuchungen (BARTHELMAI, 1968) fanden dagegen einen Abfall der Enzymaktivitäten in der Entwicklung bis zum Erwachsenenalter. Es wurden dabei aber andere Enzyme bestimmt, die z. T. mit denen des vorliegenden Versuchs übereinstimmen: G - 6 - PDH, 6 - PGDH, F - 6 - P - Kinase, Hexokinase und Phosphoglucose - Isomerase.

Bei den Adeninnucleotiden wurde eine geringe Zunahme des ATP bei gleichzeitiger Abnahme des ADP beobachtet. AMP blieb nahezu gleich. Durch die Veränderungen von ATP und ADP nahm der Quotient ATP / ADP entsprechend zu.

2) Behandlung mit Trophosphamid (10 und 20 mg / kg KG) und Placebo (physiologische NaCl - Lösung i. p.)

Die Werte für diese Versuchsgruppe konnten nur bis zum 34. Behandlungstag verfolgt werden. Am 36. und 56. Tag der Behandlung mit der höheren Dosis (20 mg / kg KG) starb je ein Tier an einer eitrigen Pneumonie. Zu der gleichen Gruppe gehörte auch das mit Placebo behandelte Tier, das am 42. Tag starb (s. S. 27). Aus diesem Grunde wurden bei der varianzanalytischen Auswertung nur die bis zum 34. Tag gemessenen Werte berücksichtigt, um noch ausreichend große Gruppenumfänge für die Berechnung verwenden zu können. Eine Aussage über die Versuchsergebnisse wurde so erschwert, denn ein fehlender Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Trophosphamid 10 und 20 mg / kg KG und physiologische NaCl - Lösung i. p.) bis zum 34. Behandlungstag bedeutet noch nicht, daß auch eine spätere Veränderung ausblieb. So zeigten die verbleibenden Tiere, die mit 20 mg Trophosphamid / kg KG behandelt wurden, nach der Bestimmung des 34. Tages eine weitere Gewichtsreduktion, die dann zu einem vermutlich signifikanten Vergleich der Gruppen geführt hätte. Bis zum 34.

Tab. 17: Mittelwerte von Erythrocyten, Leukocyten und Gewicht unter der Behandlung mit Trophosphamid und Placebo. Es sind alle Mittelwerte bis zur letzten Bestimmung nach 68 Behandlungstagen wiedergegeben. Für die Behandlung mit 20 mg / kg KG bleiben am 51. Tag 2 Tiere und am 68. Tag noch ein Tier. Die Kontrollgruppe bestand für die Bestimmungen nach dem 34. Tag noch aus 2 Tieren.

	1. Leerwert		2. Leerwert		17. Tag		34. Tag		51. Tag		68. Tag der Behandlung	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Leukocyten ($\times 10^3 / \mu\text{l}$)												
Trophosphamid 20 mg/kg	5,0	1,9	5,7	1,3	4,9	0,1	4,2	1,4	3,3	1,0	3,4	0,0
Trophosphamid 10 mg/kg	5,4	1,1	7,2	1,9	8,5	5,2	5,9	2,0	4,8	2,5	3,1	1,3
Placebo	9,7	5,1	9,4	4,0	11,4	7,2	11,8	2,8	11,1	5,4	10,4	5,0
Erythrocyten ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)												
Trophosphamid 20 mg/kg	3,7	0,3	3,7	0,4	3,8	0,2	3,5	0,6	2,5	1,4	3,2	0,0
Trophosphamid 10 mg/kg	4,3	1,2	3,7	0,2	4,1	0,7	4,5	0,5	4,4	0,4	4,2	0,5
Placebo	3,8	0,3	3,7	0,7	4,6	0,6	5,1	0,9	5,6	0,2	5,9	0,4
Gewicht (kg)												
Trophosphamid 20 mg/kg	2,2	0,0	2,3	0,1	2,6	0,1	2,4	0,2	2,3	0,3	2,3	0,0
Trophosphamid 10 mg/kg	2,5	0,3	2,7	0,7	2,9	0,5	3,0	0,5	3,2	0,6	3,2	0,6
Placebo	2,5	0,6	2,7	0,6	3,2	0,6	3,2	0,6	3,1	0,1	3,2	0,1

Tag war im statistischen Vergleich nur eine allgemeine Gewichtszunahme für alle Tiere ohne Gruppenunterschied festzustellen (Tab. 17 und Abb. 4).

Ein ähnliches Verhalten wurde für die Erythrocyten- und Leukocytenzahlen beobachtet, die bei den durchgeführten Vergleichen bis zur 4. Bestimmung bei den behandelten Tieren keinen Unterschied zu den unbehandelten ergaben. Bei den im Versuch verbleibenden Kaninchen, die mit Trophosphamid behandelt wurden, bildete sich insbesondere unter der hohen Dosis eine Anaemie und Leukopenie aus (Tab. 7).

Die Todesursachen der beiden Tiere, die 20 mg Trophosphamid /kg KG erhielten, waren eitrige Pneumonien, die wahrscheinlich auf die immunsuppressive Wirkung des Medikamentes zurückzuführen sind. Die histologischen Schnitte der Leber, die mit HE und PAS gefärbt wurden, zeigten keine deutlichen pathologischen Veränderungen.

Für Hb_E, MCHC und die basophilen Granulocyten verändern sich die Mittelwerte durch die Behandlung nicht.

Alle Tiere dieser Versuchsgruppe (Trophosphamid 20 mg und 10 mg/kg KG, Placebo) zeigen eine statistisch auffällige ($P = 0,05$) zeitliche Änderung der Reticulocyten (geringe Abnahme, Abb. 5), der Monocyten (Abfall bis zum 17. Tag, danach Anstieg, Abb. 6), der eosinophilen Granulocyten (Abfall, Abb. 7) und des MCV (Abfall, Abb. 8). Eine ebenfalls einheitliche zeitliche Änderung (ohne Gruppenunterschiede) ergibt sich für das Gewicht (Zunahme, Abb. 4), die neutrophilen Granulocyten (Zunahme, Abb. 9) und die Lymphocyten (Abnahme, Abb. 10). Die F - Werte (F_3) für diese drei Größen sind signifikant ($P = 0,01$).

Die Haemoglobinkonzentration aller Tiere steigt an ($P = 0,05$), gleichzeitig ist für die Gruppe mit 20 mg Trophosphamid / kg KG ein Haemoglobinabfall nach dem 17. Tag statistisch auffällig ($P = 0,05$, Abb. 11). Der Haematokrit fällt

unter 20 mg Trophosphamid ebenfalls ab ($P < 0,05$, Abb. 12).

Die Enzymaktivitäten verhalten sich unterschiedlich. G - 6 - PDH und PGM erfahren keine Veränderungen außer der Versuchsstreuung. Die Aktivitäten der 6 - PGDH fallen insgesamt bei allen Tieren geringfügig ab ($P < 0,05$). Unter Behandlung mit 10 mg Trophosphamid / kg KG ist nach dem 17. Tag ein Anstieg statistisch auffällig ($P < 0,05$, Abb. 13). Diese Veränderungen gelten für die Aktivität pro 10^{11} Zellen, auf g Hb und ml Zellbrei bezogen zeigt die 6 - PGDH keine Auffälligkeiten.

Für die Pyruvatkinase verlaufen die Kurven der Behandlungsgruppen nicht parallel. Die Enzymaktivitäten der Placebogruppe nehmen am stärksten ab, unter Behandlung mit 20 mg Trophosphamid ist der Abfall weniger stark, und für 10 mg Trophosphamid / kg KG ergibt sich ein Aktivitätsanstieg. Diese Unterschiede sind statistisch auffällig ($P < 0,05$) bei den Bezugssystemen g Hb und ml Zellbrei. Die Werte pro 10^{11} Zellen verhalten sich unauffällig (Abb. 14, 15, 16).

Die Glutathion - Reduktase pro 10^{11} Zellen und pro ml Zellbrei nimmt vom 2. Leerwert bis zum 17. Behandlungstag zu, bis zum 34 Tag fällt sie dann ab. Diese allgemeine zeitliche Änderung ist für die Aktivität / 10^{11} Zellen statistisch gesichert ($P < 0,01$), pro ml Zellbrei nur statistisch auffällig ($P < 0,05$). Für die GR / g Hb zeigt sich ein statistisch auffälliger Einfluß der Medikamente ($P < 0,05$), in der Placebogruppe nimmt der Enzymgehalt stärker ab (Abb. 17, 18, 19).

Die GAPDH - Aktivität pro ml Zellbrei nimmt zu ($P < 0,01$). Bei den Kontrolltieren zeigt sich nach dem 17. Behandlungstag ein Abfall (keine Parallelität der Kurven, $P < 0,05$, Abb. 20). Diese Beobachtungen gelten nicht für U/g Hb und U/ 10^{11} Zellen, die keine nachweisbaren Unterschiede zeigen.

Der Kurvenverlauf der Behandlungsgruppen für die TIM - Aktivitäten ist nicht parallel. Neben dem Anstieg der Enzymgehalte pro 10^{11} Zellen für alle Tiere ($P < 0,05$) zeigen sich Gruppenunterschiede: stärkster Abfall unter Placebos, weniger stark bei Behandlung mit 20 mg, Anstieg bei 10 mg Trophosphamid / kg KG ($P < 0,05$). Diese Gruppenunterschiede finden sich auch bei den auf ml Zellbrei ($P < 0,05$) und g Hb ($P < 0,01$) bezogenen Aktivitäten (Abb. 21, 22, 23).

FDA $U/10^{11}$ Zellen und U/ml Zellbrei : statistisch auffällige Gruppenunterschiede ($P < 0,05$) zeigen Abfall der Aktivitäten unter 20 mg Trophosphamid und Placebo während bei Behandlung mit 10 mg Trophosphamid die Enzymaktivitäten zunehmen (Abb. 24, 25). Dieses Verhalten kann für die Aktivität / g Hb nicht nachgewiesen werden (Abb. 26).

Der ATP - Gehalt ändert sich nur pro ml Zellbrei: Anstieg unter 20 mg Trophosphamid / kg KG und Placebo, nach dem 17. Tag Abfall bei Behandlung mit 10 mg Trophosphamid ($P < 0,05$, Abb. 27). Für die Konzentrationen in den anderen Bezugssystemen (ml Blut, 10^{11} Zellen, g Hb) zeigen sich keine Auffälligkeiten.

Die Ergebnisse für ADP und AMP konnten nicht zu statistischen Vergleichen herangezogen werden, da durch technische Schwierigkeiten Werte ausfielen. Dasselbe gilt für die Thrombocyten.

3) Behandlung mit Azathioprin (6 mg und 12 mg / kg KG) und Placebo (Wasser per os)

Die Behandlung mit Azathioprin wurde in den verabreichten Dosen von allen Tieren gut vertragen. Neben einer allgemeinen Zunahme ($P < 0,01$) nimmt das Gewicht unter der Behandlung mit der niedrigeren Dosis Azathioprin (6 mg/kg KG) geringfügig stärker zu als unter Placebobehandlung. Eine geringere Gewichtszunahme ergibt sich unter 12 mg / kg KG ($P < 0,01$, Abb. 28).

Die Erythrocytenzahl steigt bei allen Tieren (ohne Behandlungsunterschiede, $P < 0,01$) an. Gleichzeitig ist auch ein medikamentöser Einfluß nachweisbar (statistisch auffällig, $P < 0,05$), da die Zahl der roten Blutzellen pro ml Blut unter 12 mg Azathioprin / kg KG nicht so stark zunimmt wie unter 6 mg Azathioprin / kg KG und Placebo (Abb. 29).

Die Haemoglobinkonzentration des Blutes zeigt ebenfalls statistisch gesicherte ($P < 0$) Unterschiede bei den verschiedenen Behandlungsgruppen: bei der Kontrollgruppe und bei Behandlung mit 6 mg Azathioprin nehmen die Hb - Gehalte etwa im gleichen

Maße zu, unter 12 mg Azathioprin ist nach dem 17. Behandlungstag kein Anstieg des Haemoglobins mehr zu beobachten. Die allgemeine zeitliche Änderung (Anstieg des Haemoglobins) ist statistisch signifikant ($P < 0,01$, Abb. 30).

Der Haematokrit verhält sich der Haemoglobinkonzentration entsprechend: allgemeine zeitliche Zunahme ($P < 0,01$) und Hemmung der Zunahme durch 12 mg Azathioprin / kg KG ($P < 0,01$, Abb. 31).

Für das MCV ist eine zeitliche Abnahme ohne Gruppenunterschiede statistisch auffällig ($P < 0,05$, Abb. 32).

Reticulocyten, Hb_E, MCHC und Leukocyten zeigen keine Veränderungen außer der Versuchsstreuung. Im Differentialblutbild nehmen die neutrophilen Granulocyten bei allen Gruppen zu ($P < 0,05$, Abb. 33).

Die untersuchten Enzymaktivitäten werden bei der vorliegenden Versuchsanordnung durch die Behandlung unterschiedlich beeinflusst, oder eine Änderung läßt sich nicht nachweisen. So verändern sich die Aktivitäten der GAPDH, FDA und GR außer der Versuchsstreuung nicht.

G - 6 - PDH - Aktivitäten pro 10^{11} Zellen fallen bei allen Tieren dieser Versuchsgruppe bis zum 34. Behandlungstag geringfügig ab, anschließend erfolgt ein Anstieg bis zum 68. Tag ($P < 0,01$). Ein Unterschied der Mittelwerte durch die Behandlung ist nur statistisch auffällig ($P < 0,05$, Abb. 34). Die allgemeine zeitliche Änderung läßt sich auch für U/g Hb nachweisen ($P < 0,05$), während die Behandlungseinflüsse bei den Aktivitäten / ml Zellbrei statistisch auffallen ($P < 0,05$, Abb. 35 und 36).

Die 6- PGDH - Aktivität fällt pro g Hb und pro 10^{11} Zellen innerhalb der gesamten Versuchsgruppe ab ($P < 0,05$). Ein Einfluß der Behandlung ist nicht nachweisbar (Abb. 37, 38 und 39).

Die Hexokinase bleibt für alle Bezugssysteme und bei allen Kaninchen bis zum 34. Behandlungstag etwa gleich, hat am 51. Tag einen Anstieg und fällt zum 68. Behandlungstag wieder ab ($P < 0,01$ für U/ 10^{11} Zellen und U/g Hb, $P < 0,05$ für U/ml Zellbrei, Abb. 40, 41 und 42).

Die zeitlichen Veränderungen des PK - Gehaltes sind statistisch gesichert ($P < 0,01$). Nach dem 2. Leerwert fallen die Aktivitäten bis zum 68. Tag der Behandlung ab. Das Minimum der Enzymaktivitäten liegt bei der Bestimmung am 34. Tag (Abb. 43, 44 und 45).

Die Kurven der PGM - Aktivitäten pro 10^{11} Zellen, g Hb und ml Zellbrei verlaufen nicht parallel. Unter Placebobehandlung und 6 mg Azathioprin / kg KG fallen die Enzymgehalte gering ab, unter der höheren Dosis Azathioprin steigt die Aktivität der PGM nach dem 34. Behandlungstag an ($P < 0,05$, Abb. 46, 47 und 48).

Die TIM zeigt insgesamt einen Abfall bis zum Schluß der Behandlung. Ein Gruppenunterschied ist nicht nachweisbar. Die statistischen Berechnungen ergeben eine Auffälligkeit der zeitlichen Änderung für die Aktivitäten pro 10^{11} Zellen und ml Zellbrei, Signifikanz ($P < 0,01$) für U/g Hb (Abb. 49, 50 und 51).

Der ATP - Gehalt pro ml Blut steigt ohne Gruppenunterschied an ($P < 0,05$, Abb. 52). Für die anderen Bezugssysteme liegen keine Änderungen außer der Versuchsstreuung vor.

D. DISKUSSION

1) Diskussion möglicher Arbeitshypothesen

SONKA et al. (1962) fanden bei Versuchen in vitro, daß die Mehrzahl der cytostatischen Substanzen die Glykolyse in Erythrocyten erniedrigt, wobei die Autoren die Hemmung des Glukoseabbaues in irgendeinem Reaktionsschritt nach der Hexokinasereaktion annehmen. (So fand LÖHR (1957) beispielsweise für Cyclophosphamid eine stärkere Hemmung der GAPDH als der HK). Für die Therapie maligner Tumoren soll diese Beobachtung jedoch für die verwendeten Cytostatika in gewissem Maße ein entwertender Faktor sein, wenn gleichzeitig mit Erniedrigung des EMBDEN-MEYERHOF-Zyklus der Pentosephosphat-Shunt erhöht ist und so der Einbau des Ribose - 5 - Phosphates in das Nukleotidmolekül nicht direkt gehemmt wird.

In der vorliegenden Untersuchung spielt die Hemmung der Enzymaktivitäten durch direkte Inkubation der roten Blutzellen mit Cytostatika durch die hohe Verdünnung des Ansatzes keine Rolle. Vielmehr wurden Kaninchen über die Dauer einer Erythrocytenlebenszeit mit Cytostatika (Trophosphamid bzw. Azathioprin) behandelt und in regelmäßigen Abständen die Aktivitäten glykolytischer Enzyme und die Adenosinphosphatgehalte in Erythrocyten gemessen, um eine mögliche Störung in der Synthese der Enzymproteine festzustellen. Grundlage für diese Annahme waren die Veränderungen der Erythropoese, wie sie von BURCHENAL et al. (1953), DUME et al. (1970), HUME et al. (1966) und STARZL (1964) für Azathioprin bzw. 6 - Mercaptopurin (s. S. 4) und BRICHTA et al. (1966) und PLIESS et al. (1961) für Cyclophosphamid (s. S. 6) beschrieben wurden.

Die bisher gefundenen Veränderungen, die an Erythrocyten unter Behandlung mit Azathioprin und Trophosphamid (bzw. Cyclophosphamid) entstehen und der heutige Einblick in die Wirkungsweise dieser Medikamente ließen sowohl Zunahme als auch Abnahme der Enzymaktivitäten in den roten Zellen möglich erscheinen.

Wegen ihrer mangelnden Selektivität wirken die cytostatischen Substanzen nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf gesunde Zellen, sie wirken außerdem nicht nur auf Strukturproteine, sondern ebenfalls auf die Synthese der Enzymproteine. Dabei scheint der entscheidende Angriffspunkt für die Glykolysehemmung die von HILZ (1959) gefundene Aktivierung der Ribonukleasen zu sein. Daraus folgt in mittelbarer oder unmittelbarer Weise die Beeinflussung der Synthese von Fermenten und Cofermenten. Ob dieser Befund auch für unzerstörte Zellen gilt, ist nicht geklärt (PÜTTER, 1960). Durch eine mangelhaftes oder erniedrigtes Enzym wäre also ein Abfall der Aktivität zu erwarten gewesen.

Ein Abfall von Enzymaktivitäten hätte sich auch durch andere Wirkungsmechanismen erklären lassen. Für alkylierende Cytostatika beruht die primäre Einwirkung offensichtlich nicht in der Beeinträchtigung der Glykolyse (HILZ et al. 1959), sondern das NAD-System ist der wesentliche Angriffspunkt (HOLZER et al., 1958, LÖHR et al., 1959, PÜTTER, 1960, ROITT, 1956). Die daraus folgende Hemmung von Enzymaktivitäten wird durch den NAD-Abfall erklärt, da Nicotinsäureamidzusatz die Glykolysehemmung rückgängig machen kann (GERLICH, 1960, HOLZER et al., 1958, LÖHR et al., 1959, PÜTTER, 1960). Wie wichtig NAD bzw. NADP zur Verhinderung von Inaktivierung und Denaturierung von Enzymen sind, zeigen Untersuchungen von PFLEIDERER et al. (1957). Bei der Alkylantienwirkung ist wahrscheinlich weniger der totale NAD-Gehalt (GERLICH, 1960, HOLZER et al., 1958, PÜTTER, 1960, ROITT, 1956) von Bedeutung als die Verschiebung des Ist-Potentials von NAD / NADH mit daraus folgender Verschiebung des Lactat / Pyruvat-Quotienten (LÖHR, 1960).

Alle diese erwähnten Einwirkungen von Alkylantien gelten für Tumorzellen (Ascitestumorzellen, JENSEN-Sarkom). Eine kritiklose Übertragung dieser Befunde auf normale rote Blutzellen ist auch bei der nahen Verwandtschaft von normalen Zellen mit Tumorzellen und der daraus resultierenden mangelnden Spezifität der Cytostatika (HEILMEYER, 1954) ohne entsprechende Versuche problematisch. So

konnte zwar ein Abfall des NAD-Spiegels im Blut von Tumorkranken unter Cytostatika (ENDOXAN^R und E 39) gefunden werden, an isolierten Leukozyten wurde aber keine Erniedrigung des spezifischen NAD-Gehaltes durch cytostatische Therapie festgestellt (BOLT et al., 1960). Außerdem kann bei der vorliegenden Versuchsanordnung eine mögliche Hemmung der Glykolyserate nicht beurteilt werden, da nur die direkten Enzymaktivitäten gemessen wurden. Eine Verminderung der Enzymaktivitäten durch NAD-Erniedrigung wäre durch die ausreichende NAD-Konzentration in den Versuchsansätzen nicht sichtbar geworden. Durch unsere Anordnung hätte man also lediglich die Verminderung der Enzymkonzentration durch Synthesestörung oder durch Alterungsvorgänge nachweisen können.

Daß die vorzeitige Alterung der Erythrocyten als Ursache für eine Verminderung der Enzymaktivitäten in Frage kommt, zeigt die Verkürzung der Erythrocytenlebensdauer unter cytostatischer Therapie (KÜNKEL et al., 1964, MAUSS, 1963, STRUBELT, 1965, WOLF et al., 1960, WOLF et al., 1960). Dieser Befund beruht nach WALLER (1960) auf einer Schädigung besonders empfindlicher Enzyme der Erythrocyten und damit der Beschleunigung der physiologischen Alterungsvorgänge.

Bei Verlust an Enzymaktivitäten durch Alterungsvorgänge wäre dann bei unseren Versuchen für die verschiedenen Enzyme eine unterschiedlich starke Inaktivierung nachweisbar gewesen: Die Aktivitäten der G-6-PDH und GAPDH fallen bei alternden Blutzellen am stärksten ab (KAHRIG, 1962, LÖHR et al., 1959, LÖHR et al., 1962, MARKS, 1957, MARKS et al., 1958, MARKS et al., 1959), gleichzeitig nimmt der Gesamtgehalt an Adenosinphosphaten ab, mit Verschiebung des ATP/ADP - Verhältnisses zugunsten des ADP (LÖHR et al., 1959). Die G-6-PDH und GAPDH scheinen damit Prädilektionsstellen der Zellalterung zu sein, wodurch der Pentosephosphatzyklus (G-6-PDH) eine Unterbrechung erfährt und die

Glykolyse gehemmt wird. Die übrigen Enzyme fallen in geringerem Ausmaße ab (GRIMES, 1963, LÖHR et al., 1958, LÖHR et al., 1959, MARKS et al., 1958, MARKS et al., 1958, RAPOPORT, 1962, SARI et al., 1965).

Neben den bisher beschriebenen Arbeitshypothesen, die alle einen Abfall von Aktivitäten der erythrocytären Enzyme vermuteten, war jedoch insbesondere unter der Therapie mit Azathioprin eine Erhöhung der Enzymgehalte möglich. DUME et al., (1970), KÖLLE (1969), MERRIL (1968) und MICHOT (1968) beobachteten unter Azathioprin eine megaloblastäre Reaktion des Knochenmarks. Die Enzymaktivitäten der roten Zellen und die Glykolyserate zeigen bei makrocytären Anaemien erhöhte Werte (BOCK et al., 1958, BOCK et al., 1958, HELLER et al., 1960, HELLER et al., 1960, HUBER et al., 1963, MARKS, 1958, ULTMANN et al., 1957). Als Ursache wird die Vergrößerung des Erythrocyteneinzelvolumens genannt, da die Aktivitätserhöhung pro Zellzahl deutlicher ist als pro g Hb. Gleichzeitig wird jedoch auch angenommen, daß die Erythrocytenpopulation vorwiegend aus jungen, nicht reticulierten Zellen besteht (HELLER et al., 1960, HUBER et al., 1963), während für die Erhöhung der Erythrocytenenzyme bei hepatogenen Anaemien die Steigerung eines humoralen Wirkungsprinzips oder die Verminderung eines Hemmmechanismus für die Erythropoese angenommen wird (BOCK, et al., 1956).

2) Kritische Wertung der gefundenen Ergebnisse

Zeitliche Veränderungen der gefundenen Werte, die auf eine Wirkung der Medikamente zurückzuführen sind, konnten in der vorliegenden Arbeit nur für Gewicht (geringere Gewichtszunahme unter der höheren Dosis), Haemoglobingehalt des Blutes und Haematokrit (keine Zunahme unter der höheren Dosis) unter der Behandlung mit Azathioprin statistisch gesichert werden. Die Enzymaktivitäten und Adenosinphosphatkonzentrationen verhalten sich uneinheitlich, Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren nur statistisch auffällig. (Keine Änderung bei 6-PGDH, Hexokinase, PK, GK, GAPDH, TIM, FDA und ATP, statistisch auffällige Veränderungen durch die medikamentöse Behandlung für G-6-PDH ($U/10^{11}$ Zellen und U/ml Zellbrei) und PGM (alle Bezugssysteme), keine signifikanten Behandlungseinflüsse)

Für die Behandlung mit Trophosphamid wurde die Auswertung der Ergebnisse dadurch erschwert, daß Versuchswerte durch den Tod zweier Tiere unter Therapie mit 20 mg/kg KG nur bis zum 34. Behandlungstag verglichen werden konnten. Gruppenunterschiede (Gruppen mit verschiedener Dosis Trophosphamid und Placebo) waren allenfalls statistisch auffällig ($P < 0,05$), das Verhalten der Enzymaktivitäten und der Adenosinphosphatgehalte war auch hier uneinheitlich (keine Beeinflussung durch das Medikament für G-6-PDH, Hexokinase und PGM, statistisch auffällige Änderungen durch Medikamenteneinfluß für 6-PGDH ($U/10^{11}$ Zellen), PK (U/ml Zellbrei), GR (U/ml Zellbrei), GAPDH (U/ml Zellbrei), TIM ($U/10^{11}$ Zellen und U/ml Zellbrei), FDA ($U/10^{11}$ Zellen und U/ml Zellbrei) und ATP (U Mol/ml Zellbrei), signifikante Beeinflussung durch die Behandlung für TIM (U/g Hb)).

Da die Enzymaktivitäten und Konzentrationen von ATP, ADP und AMP unter der durchgeführten Cytostatikatherapie keine statistisch signifikanten Veränderungen erfuhren, muß die endgültige Beurteilung einer weiteren Untersuchung mit größeren Versuchsgruppen vorbehalten bleiben. Möglicherweise lassen sich mit diesen vergrößerten Versuchsgruppen kleine Unterschiede nachweisen. Dabei kann eine Verlängerung des Behandlungs- und Beobachtungszeitraumes über eine Erythrocytenlebensdauer sinnvoll sein, um eine noch stärkere Hemmung des Knochenmarkes zu erzielen.

Bei den statistisch gesicherten Veränderungen einiger Meßdaten, die sich während der Behandlungszeit für alle Tiere einheitlich ergaben (Zunahme der neutrophilen Granulocyten, des Gewichts, der Erythrocytenzahl und des Haemoglobingehaltes, Abnahme der Lymphocyten), dürfte es sich um Wachstumsvorgänge handeln.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Achtzehn mischrassige Kaninchen wurden mit zwei cytostatischen Substanzen unterschiedlicher Wirkungsweise oder Placebo zur Kontrolle über 68 Tage behandelt. Es wurden Versuchsgruppen mit je drei Tieren zusammengestellt und mit 10 bzw. 20 mg Trophosphamid pro Kilogramm Körpergewicht, Placebo i. p., 6 bzw. 12 mg Azathioprin pro Kilogramm Körpergewicht oder Placebo per os behandelt. Nach zwei Leerbestimmungen vor Beginn der Behandlung wurden in siebzehntägigen Abständen folgende Größen gemessen:

1. Zahl der Erythrocyten, Reticulocyten, Thrombocyten und Leukocyten mit Differentialblutbild,
2. Haemoglobingehalt und Haematokritwert sowie aus ihnen berechenbare Größen,
3. neun intraerythrocytäre Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels (Hexokinase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, Fruktose-Diphosphat-Aldolase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglycerat-Mutase, Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase, Pyruvatkinase und die Glutathion-Reduktase),

4. die Adeninnukleotide im Gesamtblut (ATP, ADP, AMP).

Enzyme und Phosphate wurden auf 10^{11} Zellen, Gramm Haemoglobin und Milliliter Zellbrei bezogen. Die gemessenen Änderungen wurden mit der partiell hierarchischen Varianzanalyse geprüft.

Änderungen der Erythrocyten-, Granulocyten- und Lymphocytenzahl, des Haemoglobingehaltes und des Gewichtes, die sich für alle Tiere ohne Behandlungsunterschiede ergaben, dürften auf Wachstumsvorgängen beruhen.

Größere Einflüsse cytostatischer Behandlung auf intraerythrocytäre Enzymaktivitäten und Adenosinphosphatkonzentrationen im Gesamtblut konnten durch die vorliegende Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Für die Enzymaktivitäten und Adenosinphosphatgehalte wurden durch die Behandlung mit Azathioprin oder Trophosphamid keine einheitlichen Änderungen gefunden, die gemessenen Zu- oder Abnahmen der

Aktivitäten oder Konzentrationen waren lediglich statistisch auffällig ($P < 0,05$).

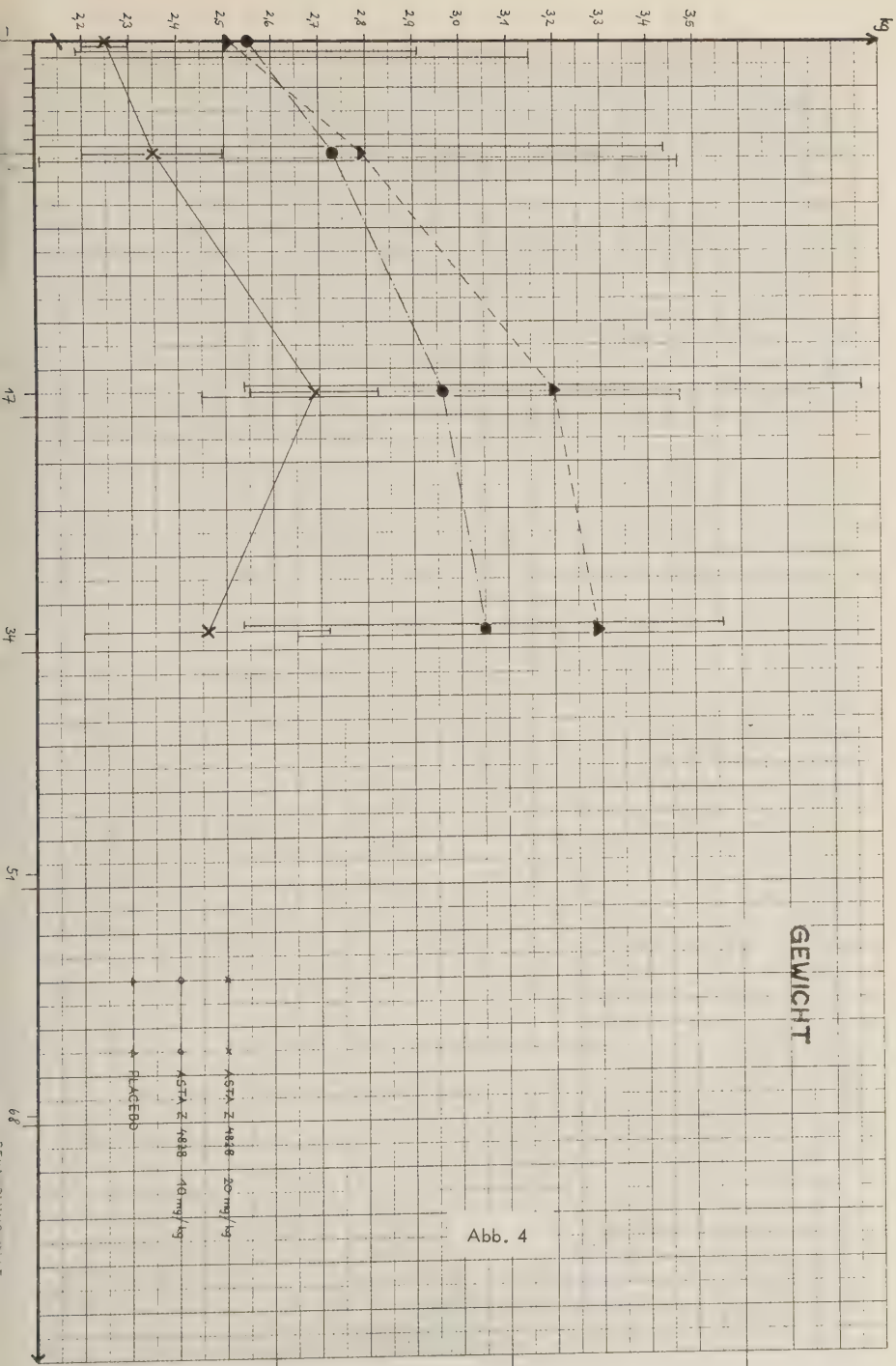
In der Serie mit Azathioprin - Behandlung zeigten die einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Gewichtszunahme und Haemoglobin- bzw. Haematokritveränderung (Wechselwirkung: $P < 0,01$).

Die Aussagen über die Trophosphamidbehandlung wurden dadurch erschwert, daß die Werte durch den Ausfall einiger Tiere nur bis zum 34. Behandlungstag verglichen werden konnten.

Die möglichen Arbeitshypothesen für den Einfluß cytostatischer Therapie auf Enzymaktivitäten und Adeninnukleotidgehalte werden diskutiert und die vorliegende Versuchsanordnung kritisch betrachtet.

Abb. 4 - 52

Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen für
die angegebenen Meßgrößen.



RETICULOCYTEN

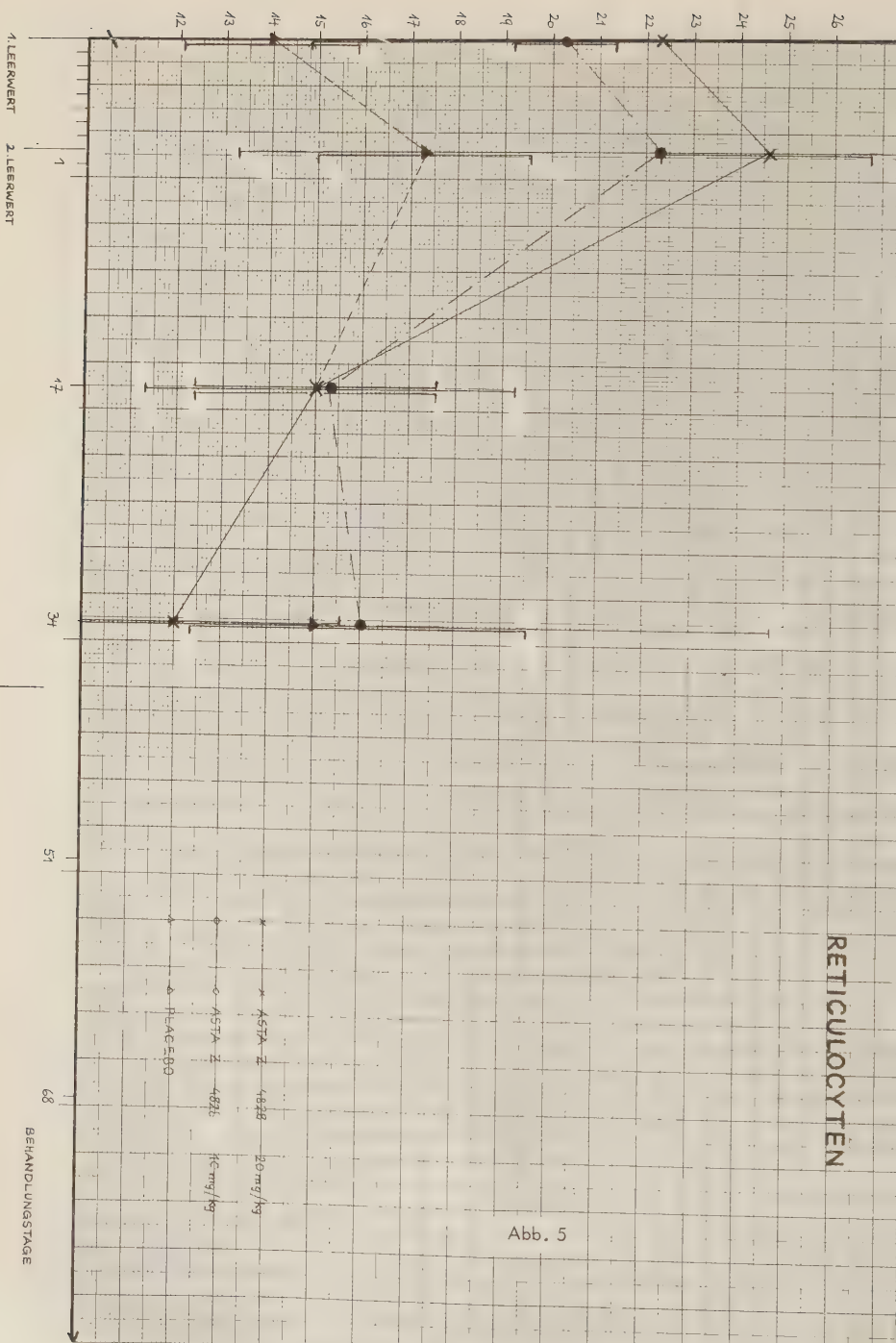


Abb. 5

MONOCYTEN

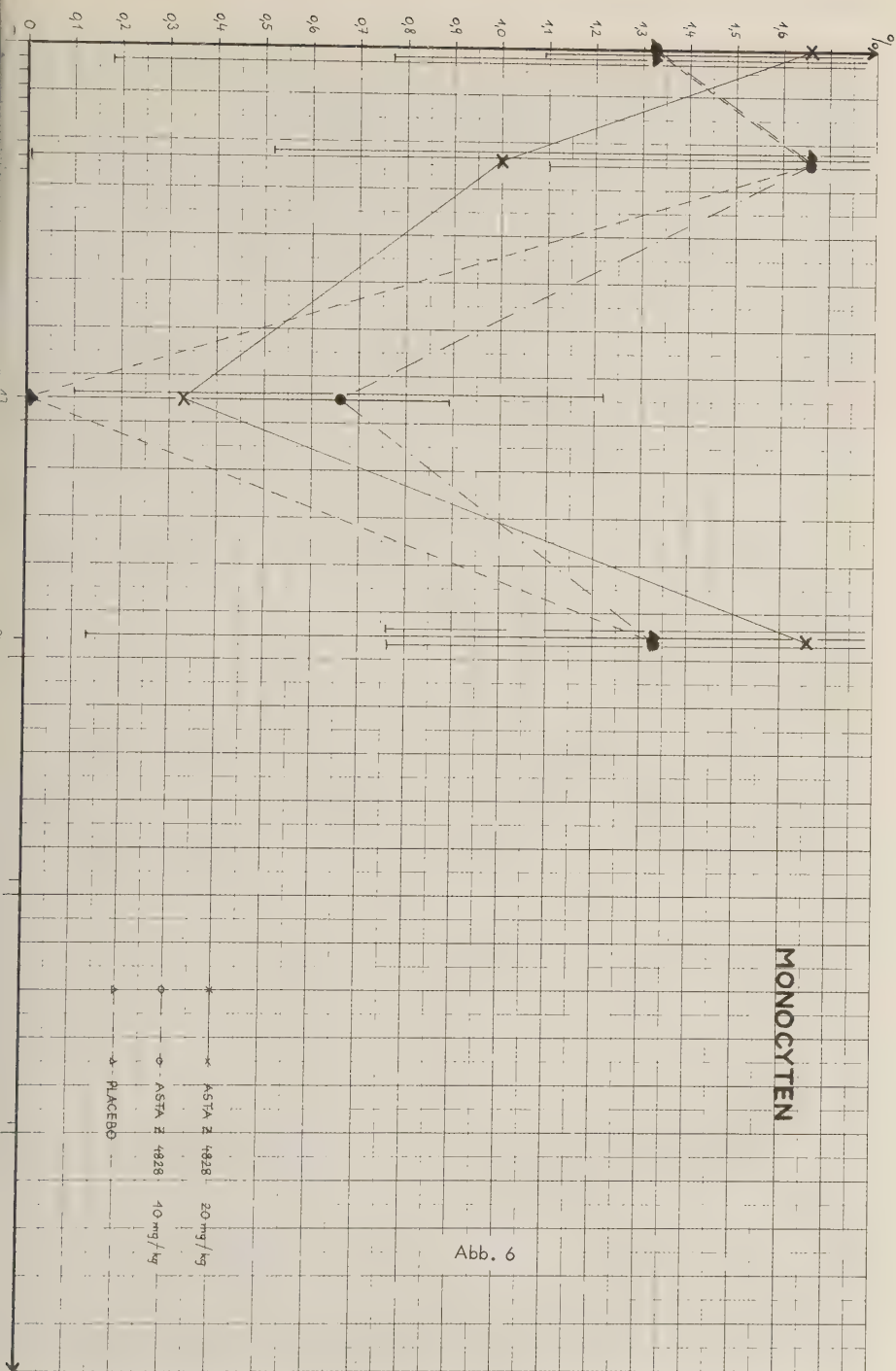
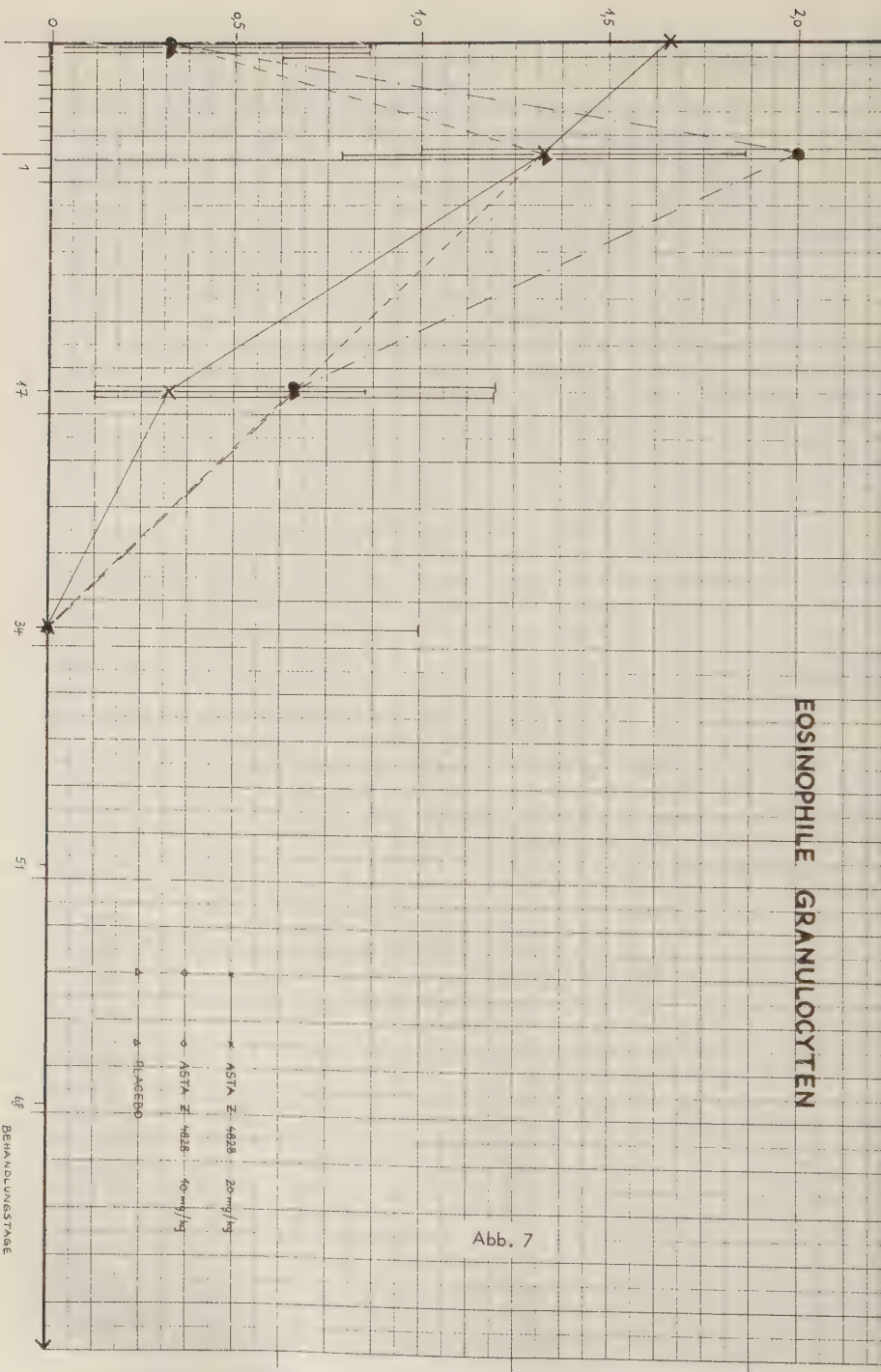
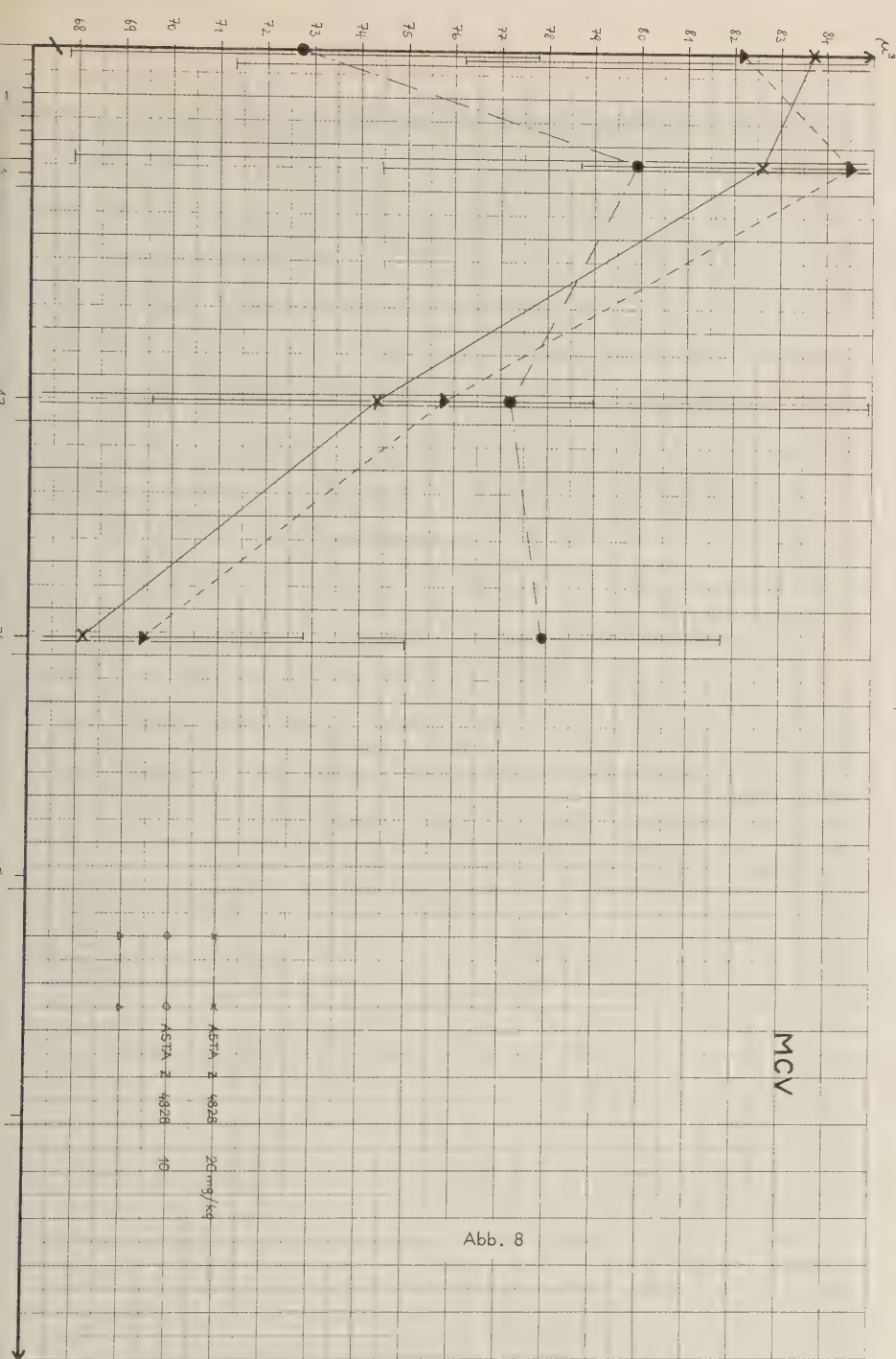


Abb. 6

EOSINOPHILE GRANULOCYTEN

Abb. 7





NEUTROPHILE GRANULOCYTEN

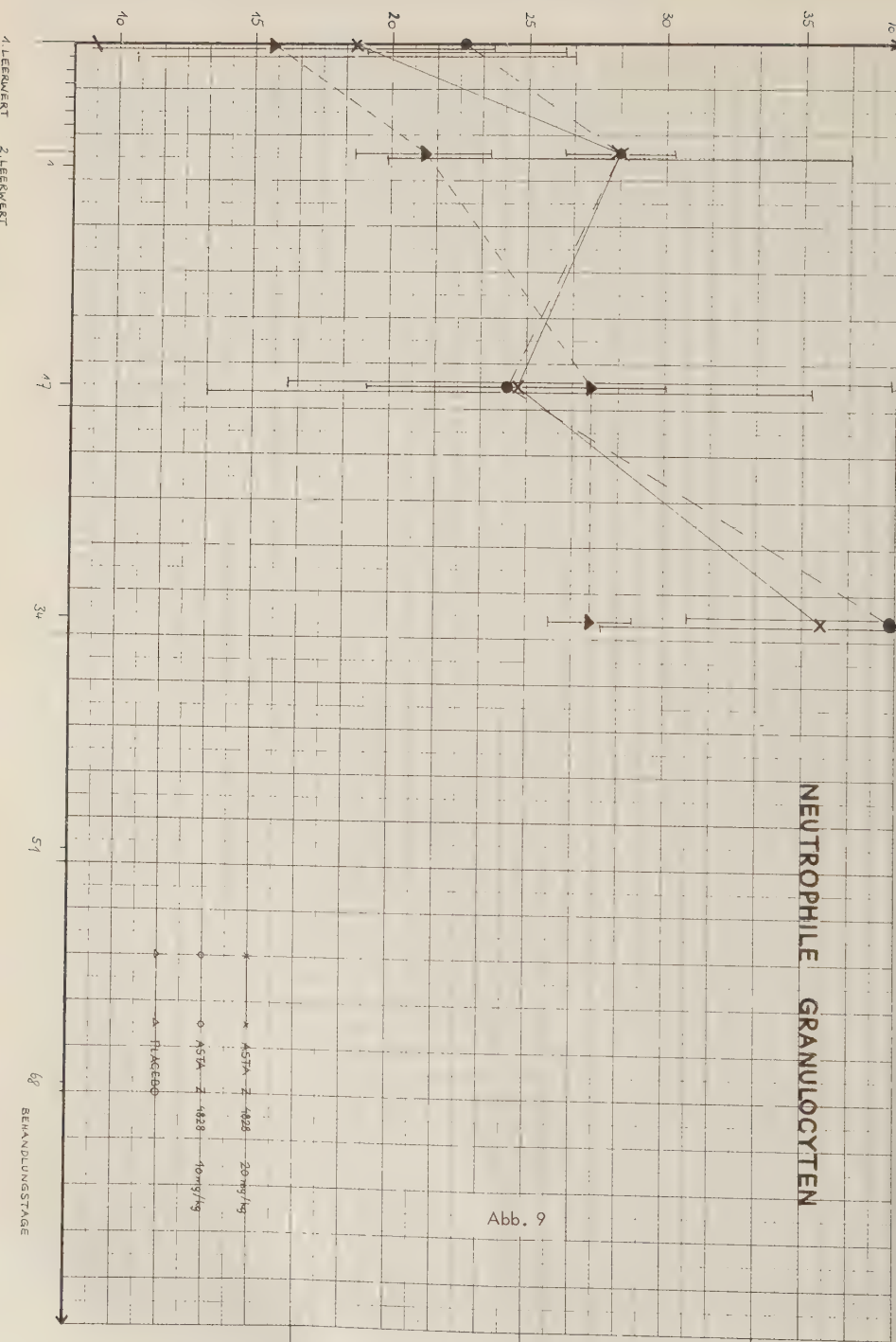
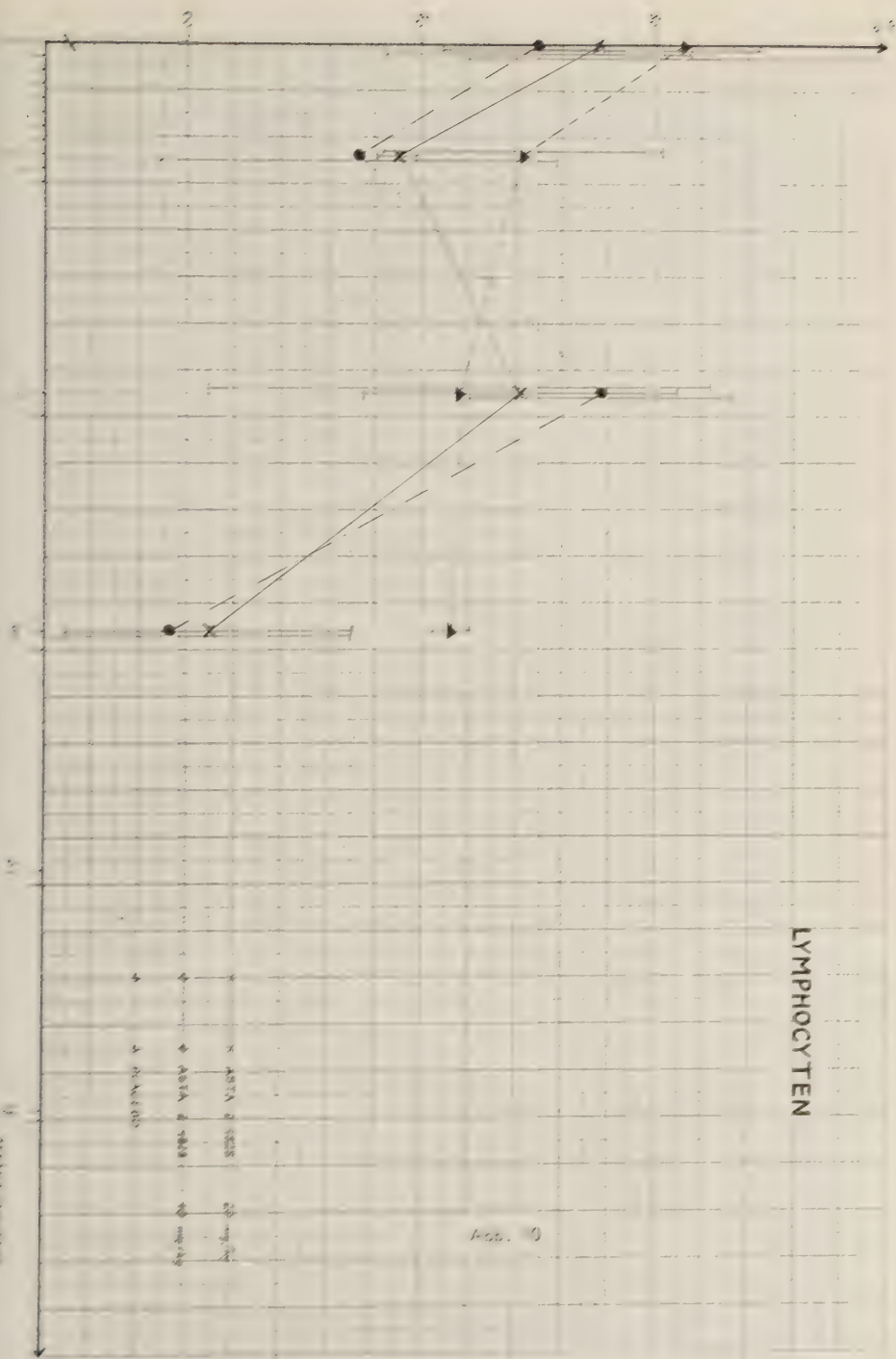


Abb. 9

LYMPHOCYTES

test. 9

1. 100%
 2. 100%
 3. 100%
 4. 100%
 5. 100%
 6. 100%
 7. 100%
 8. 100%
 9. 100%
 10. 100%
 11. 100%
 12. 100%
 13. 100%
 14. 100%
 15. 100%
 16. 100%
 17. 100%
 18. 100%
 19. 100%
 20. 100%
 21. 100%
 22. 100%
 23. 100%
 24. 100%
 25. 100%
 26. 100%
 27. 100%
 28. 100%
 29. 100%
 30. 100%
 31. 100%
 32. 100%
 33. 100%
 34. 100%
 35. 100%
 36. 100%
 37. 100%
 38. 100%
 39. 100%
 40. 100%
 41. 100%
 42. 100%
 43. 100%
 44. 100%
 45. 100%
 46. 100%
 47. 100%
 48. 100%
 49. 100%
 50. 100%
 51. 100%
 52. 100%
 53. 100%
 54. 100%
 55. 100%
 56. 100%
 57. 100%
 58. 100%
 59. 100%
 60. 100%
 61. 100%
 62. 100%
 63. 100%
 64. 100%
 65. 100%
 66. 100%
 67. 100%
 68. 100%
 69. 100%
 70. 100%
 71. 100%
 72. 100%
 73. 100%
 74. 100%
 75. 100%
 76. 100%
 77. 100%
 78. 100%
 79. 100%
 80. 100%
 81. 100%
 82. 100%
 83. 100%
 84. 100%
 85. 100%
 86. 100%
 87. 100%
 88. 100%
 89. 100%
 90. 100%
 91. 100%
 92. 100%
 93. 100%
 94. 100%
 95. 100%
 96. 100%
 97. 100%
 98. 100%
 99. 100%
 100. 100%



HAEMOGLOBIN

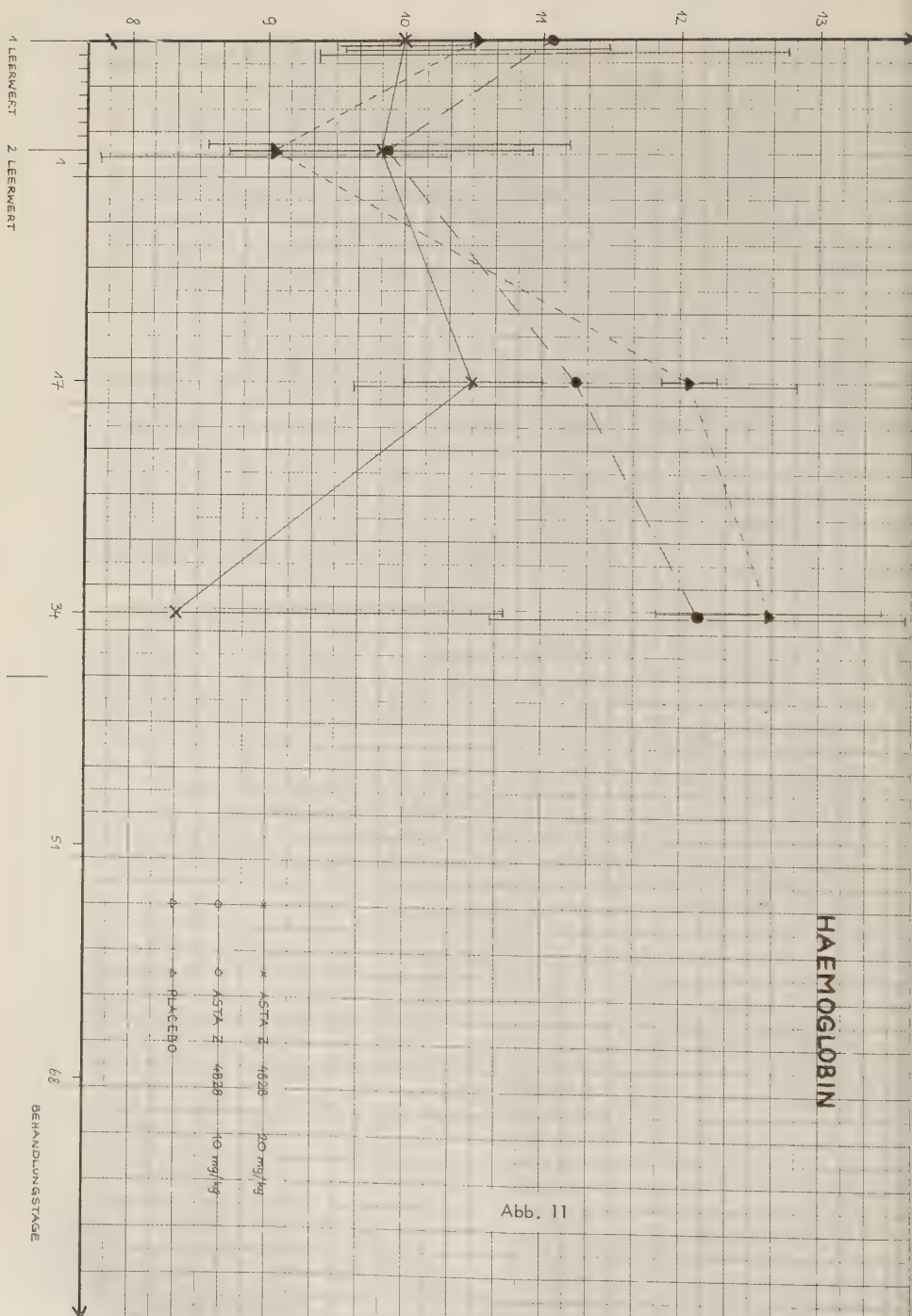


Abb. 11

HAEMATOKRIT

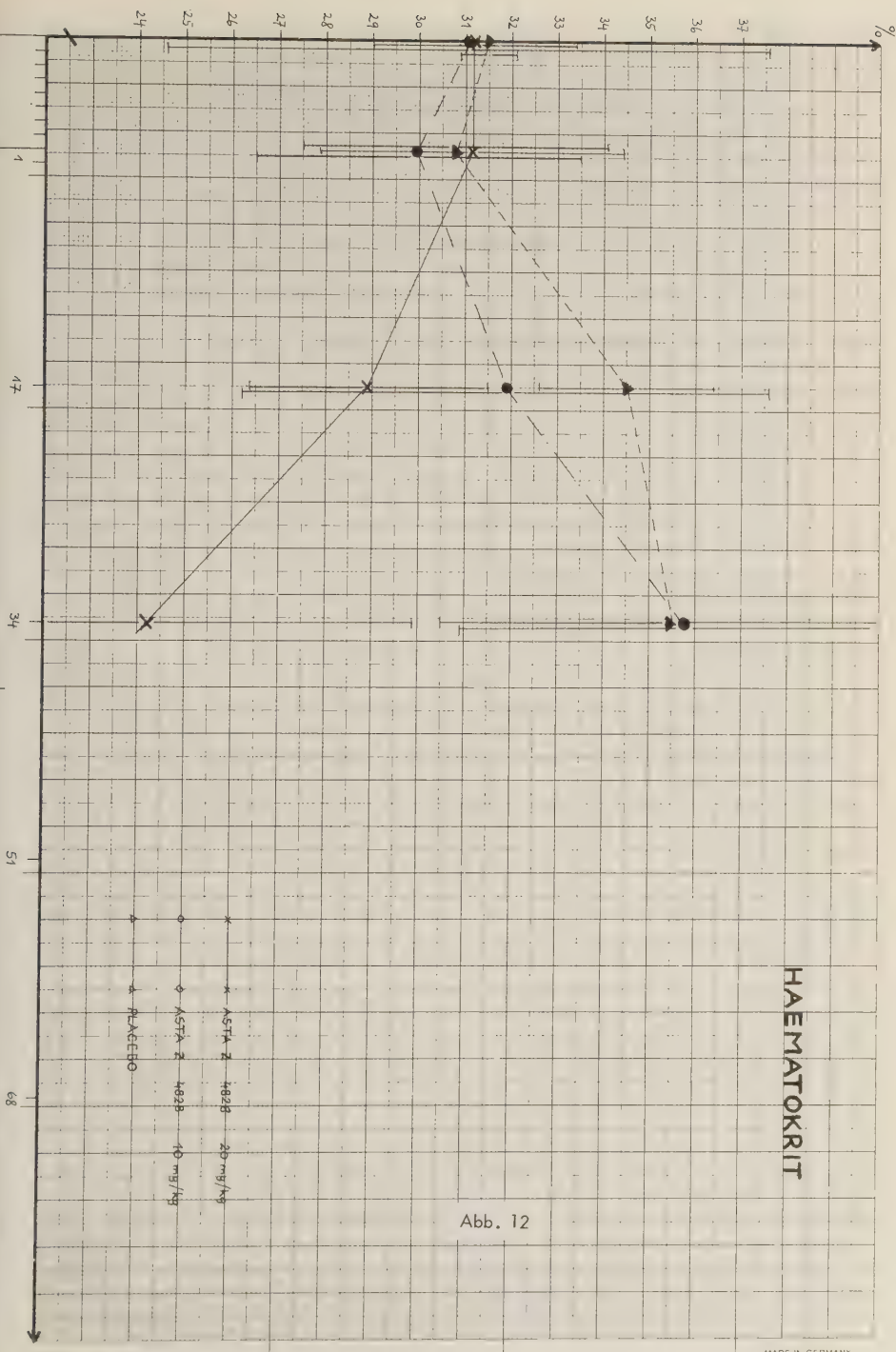


Abb. 12

6-PGDH

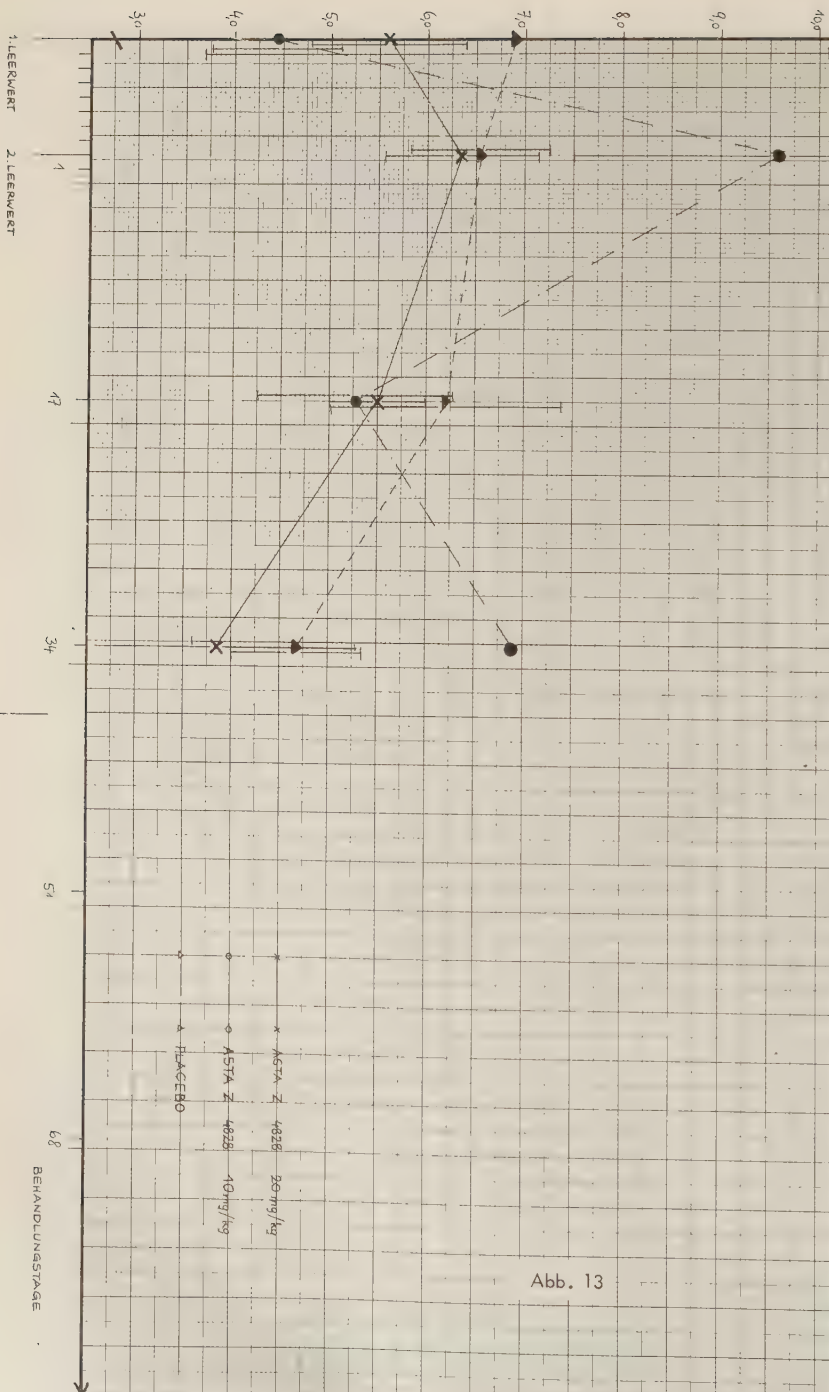
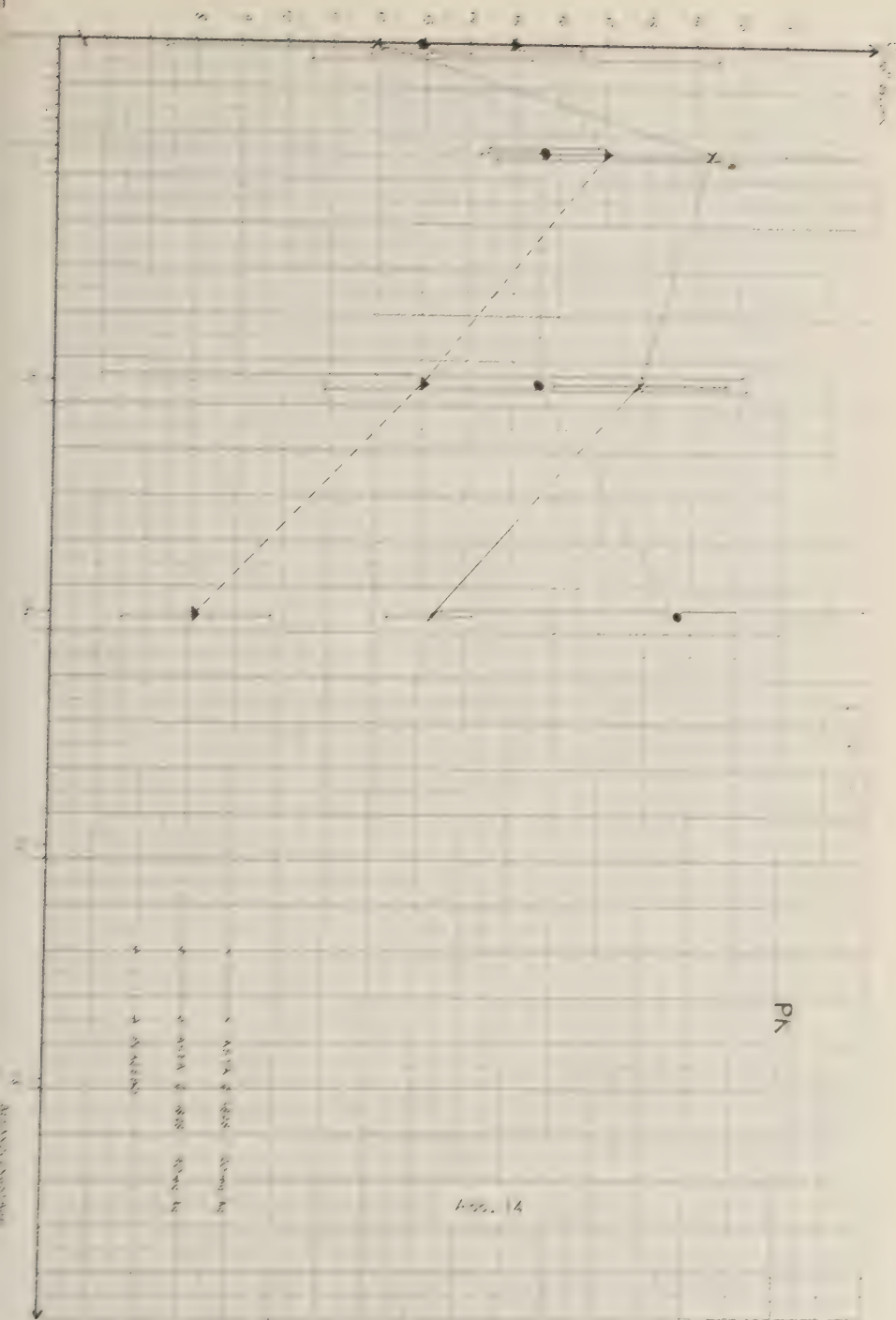
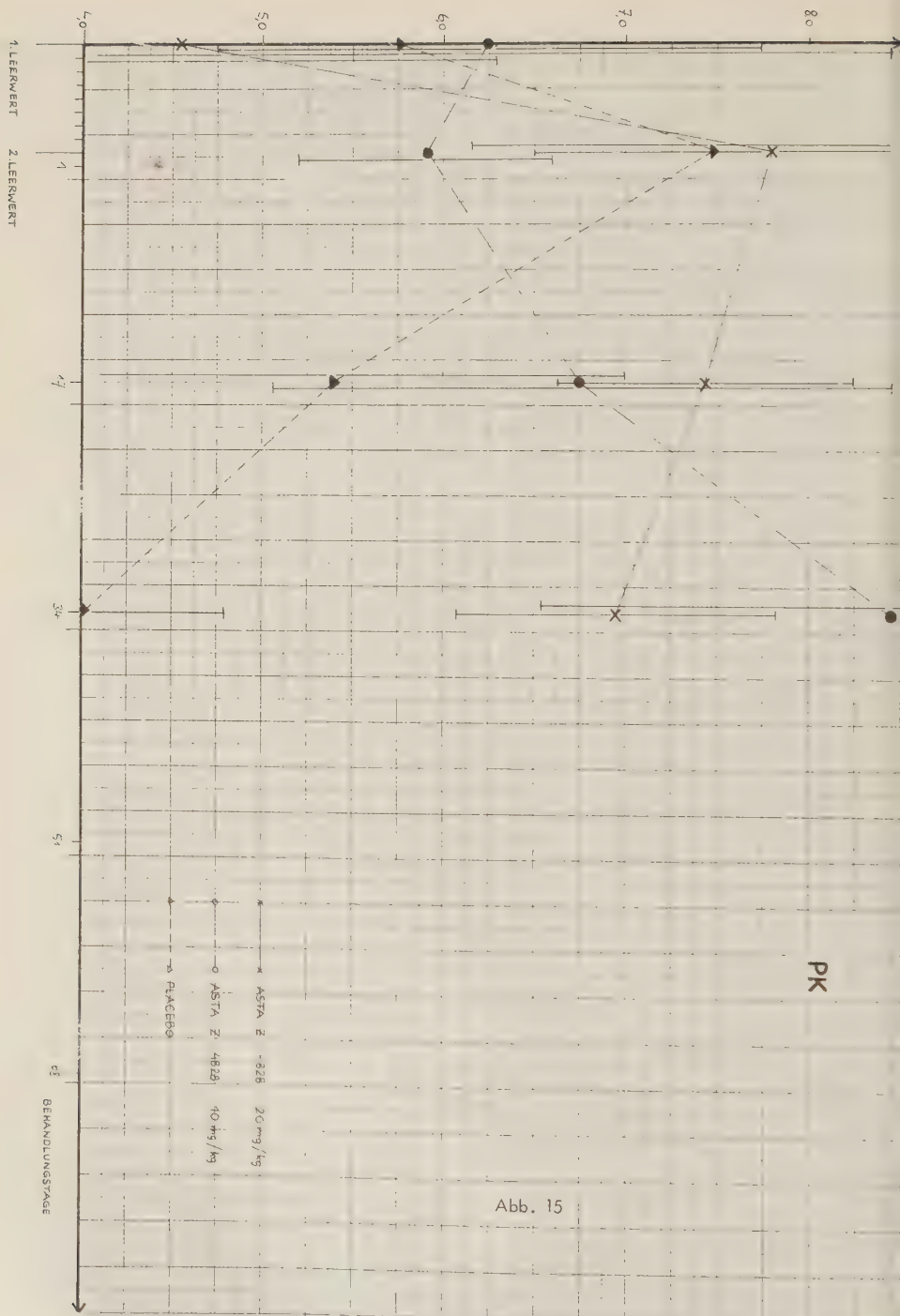


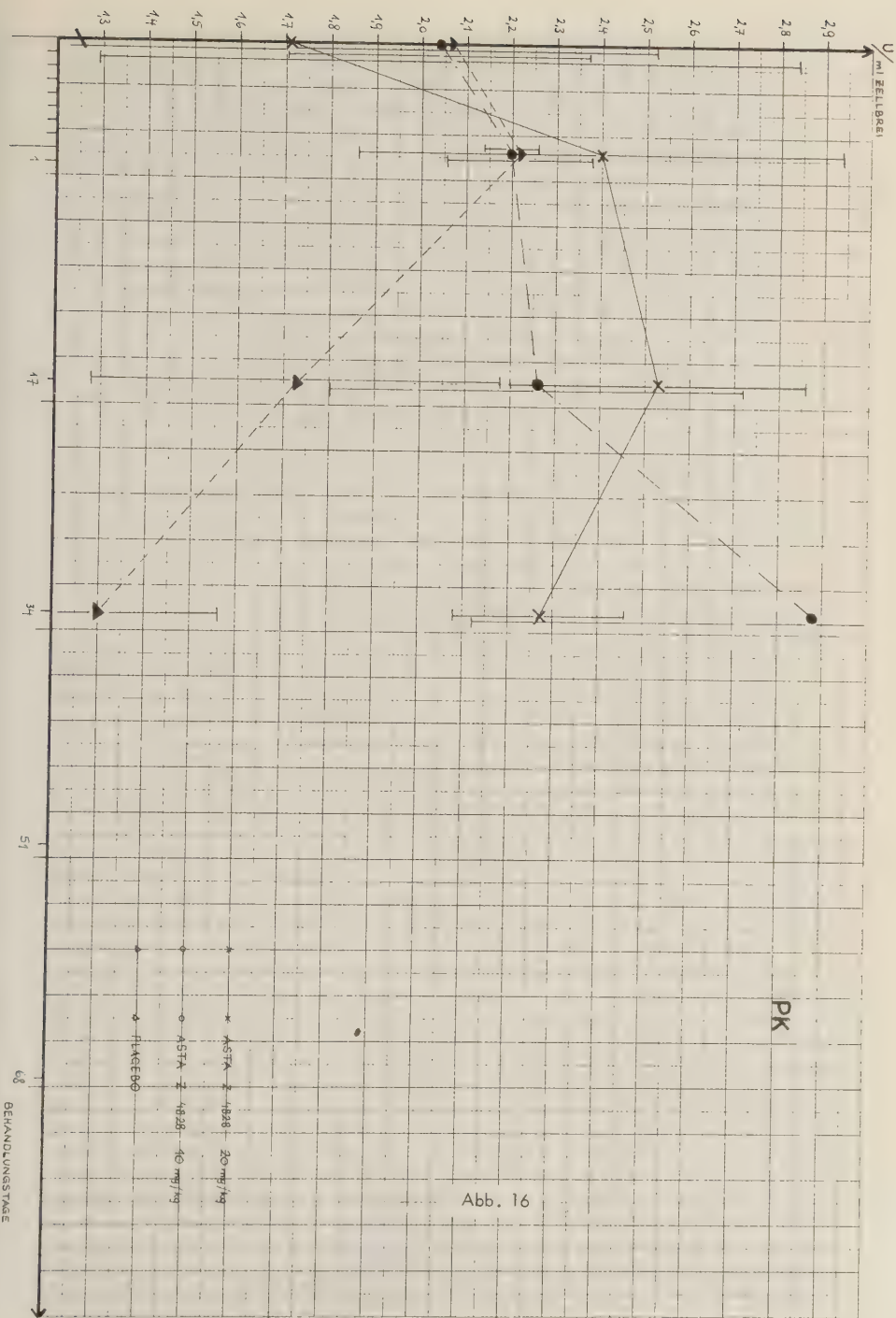
Abb. 13





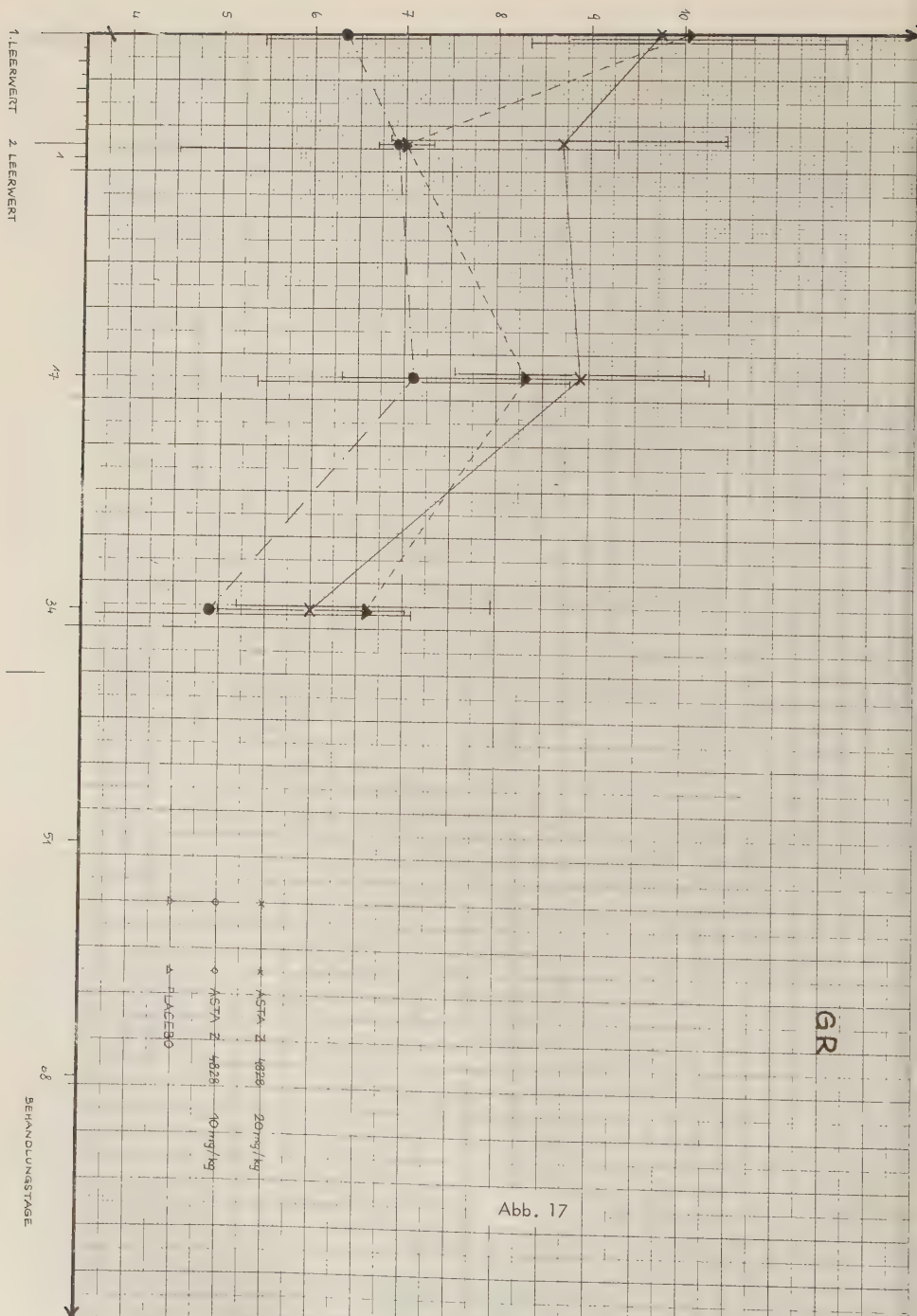
PK

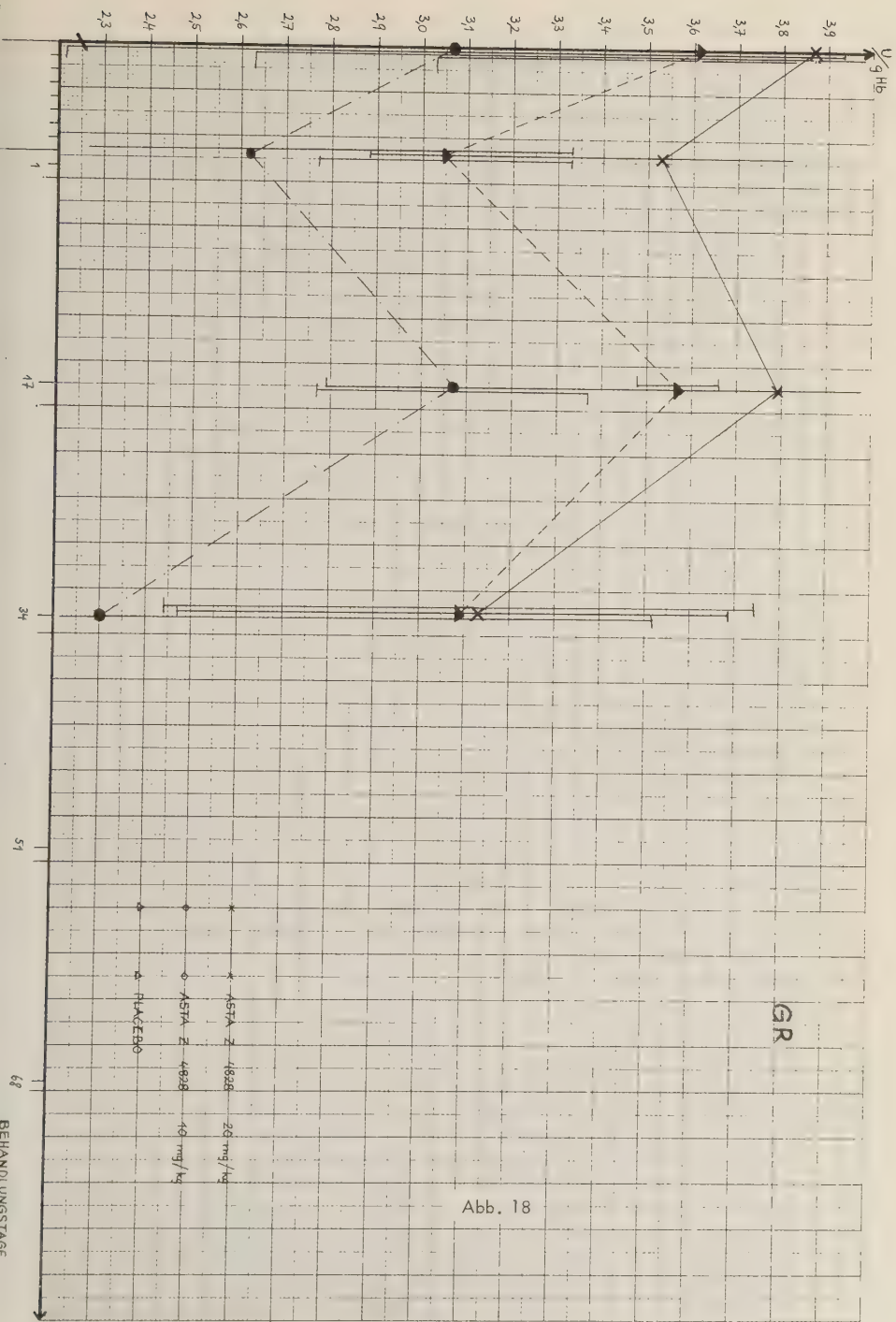
Abb. 15

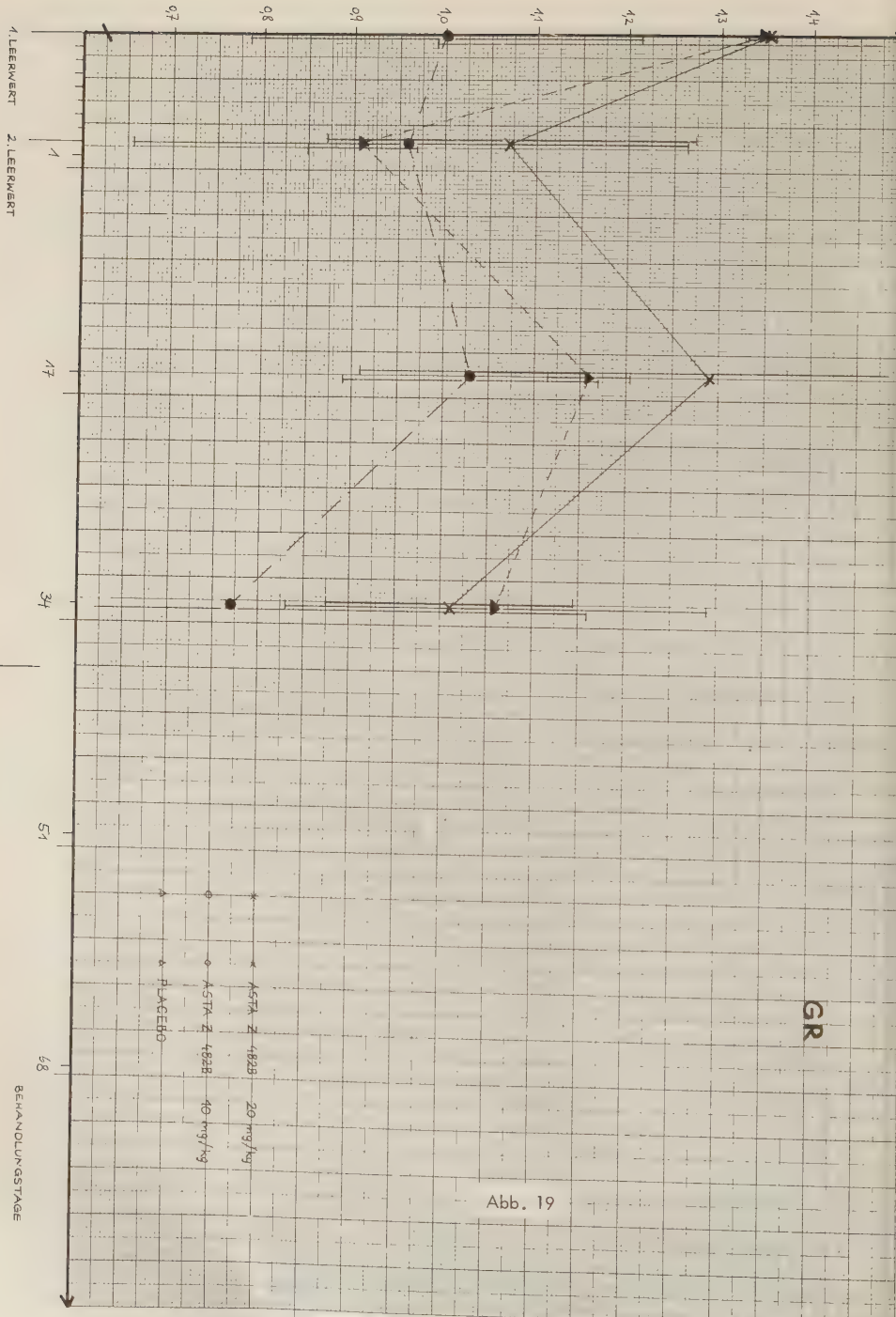


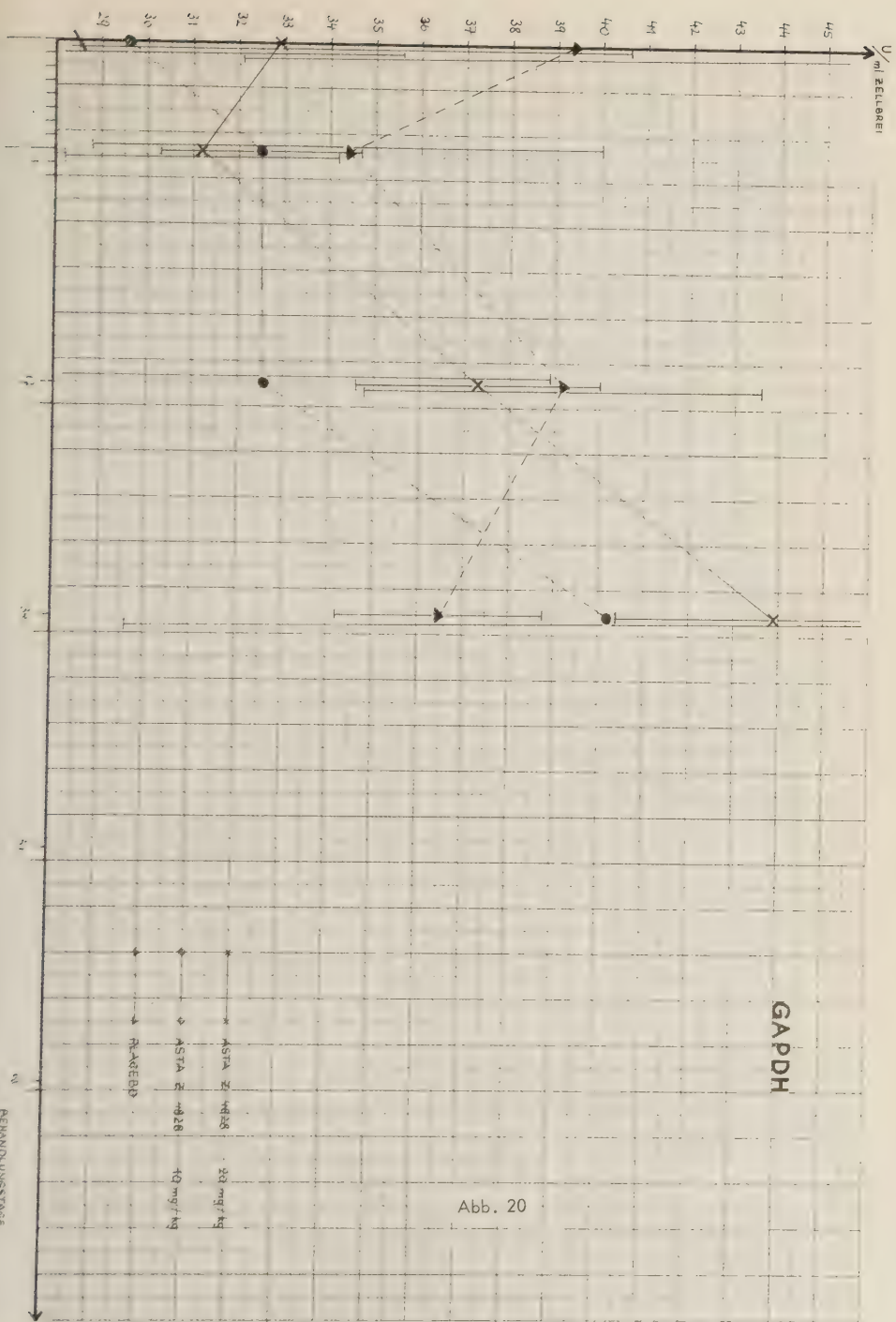
GR

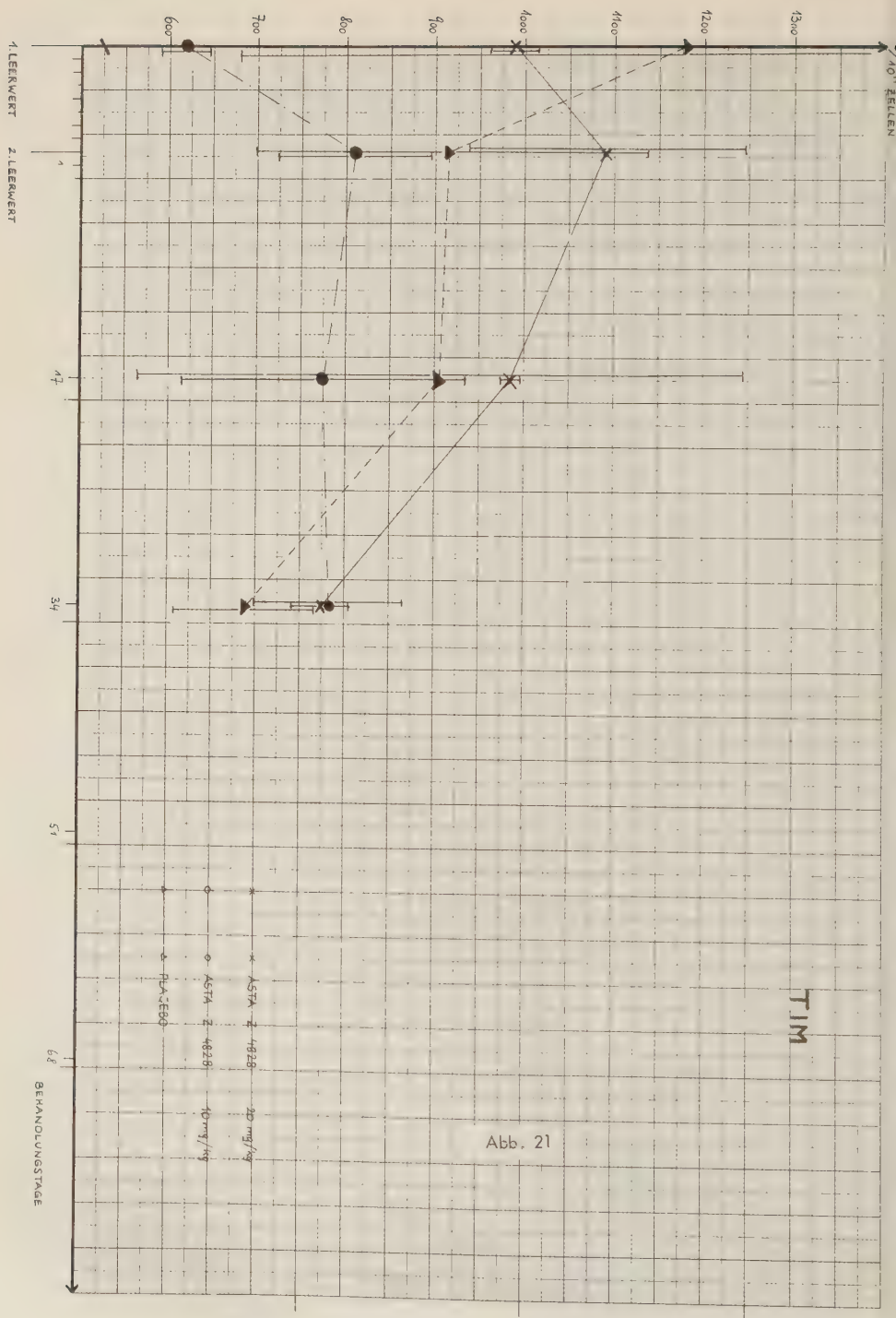
Abb. 17











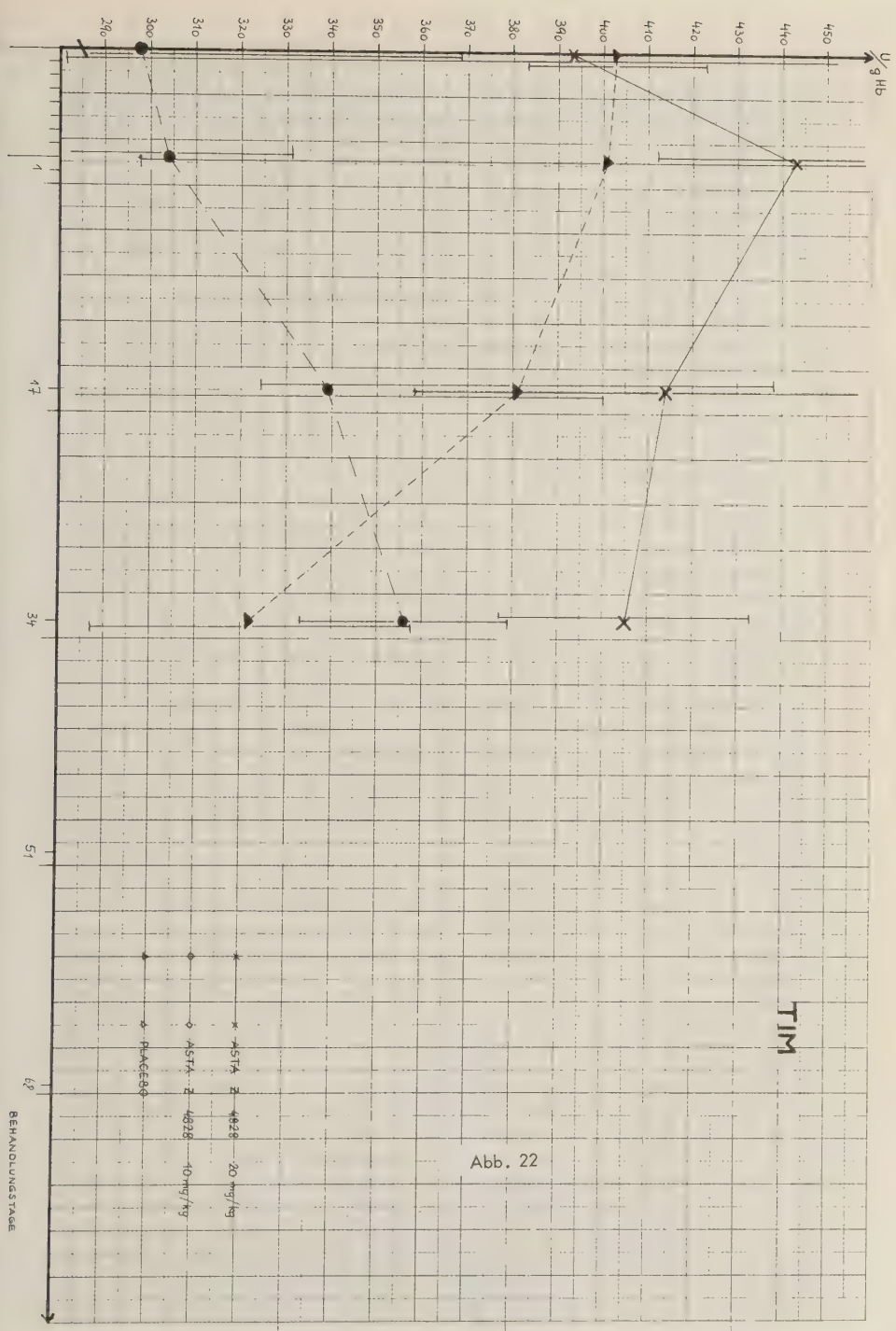


Abb. 22

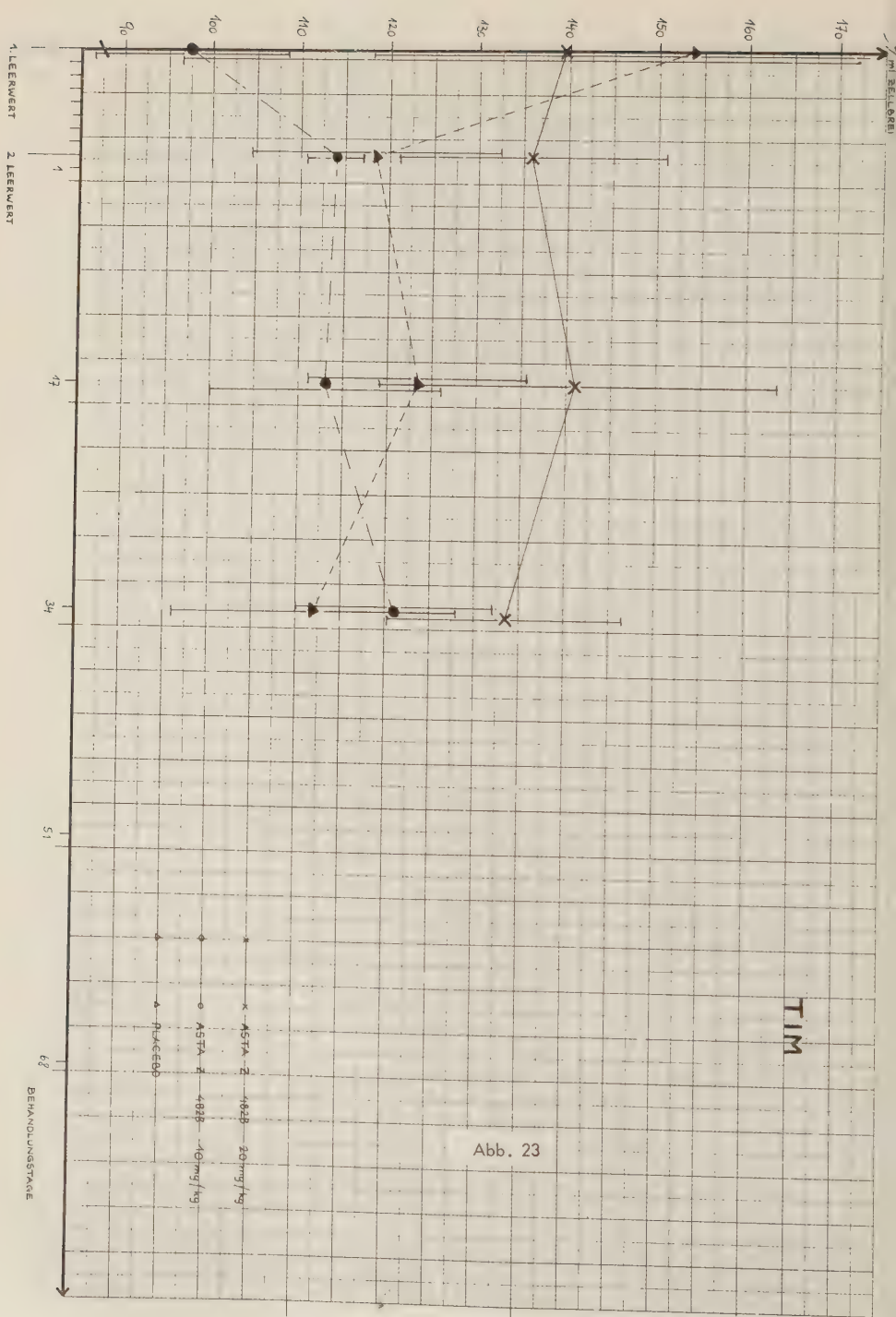
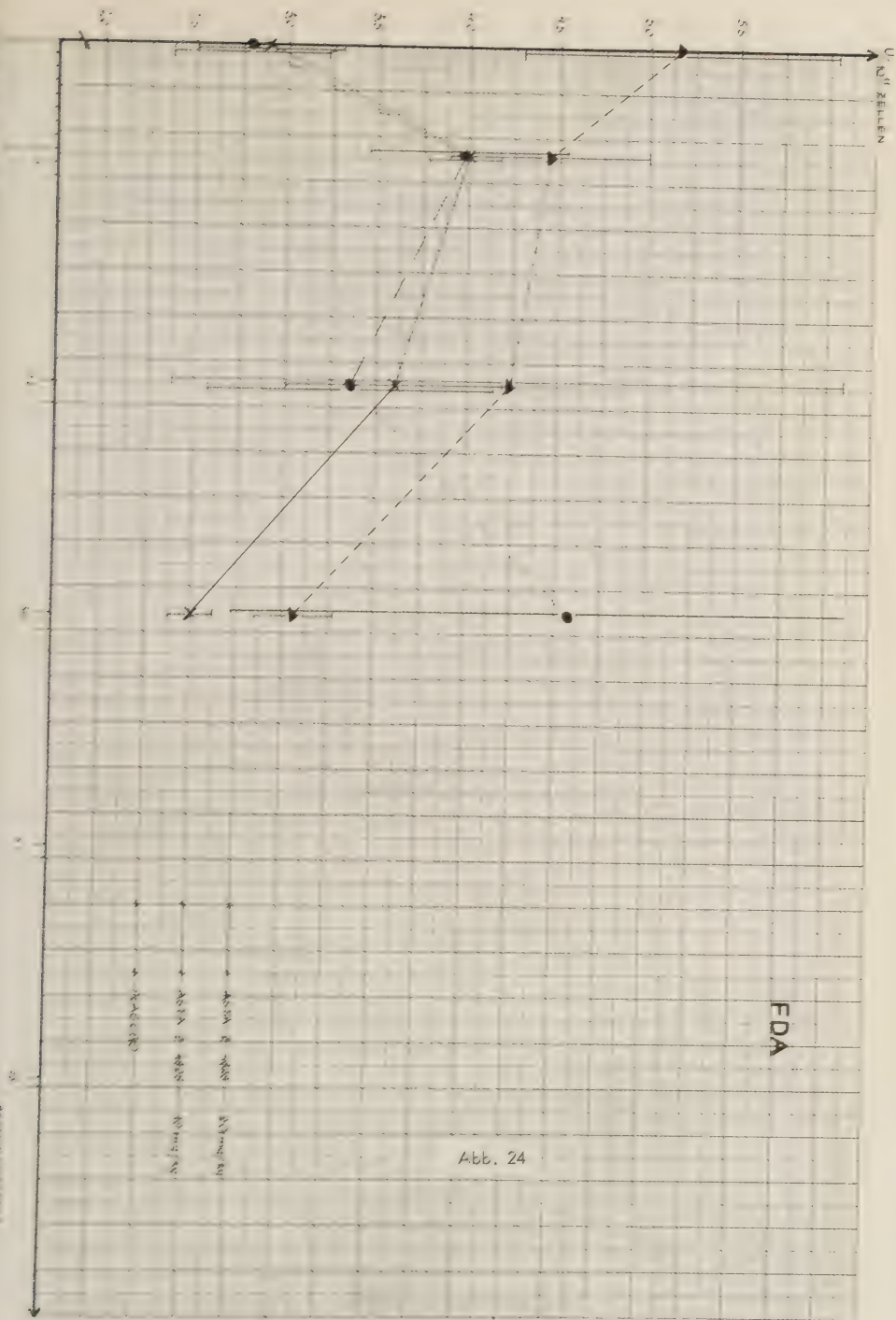


Abb. 23



FDA

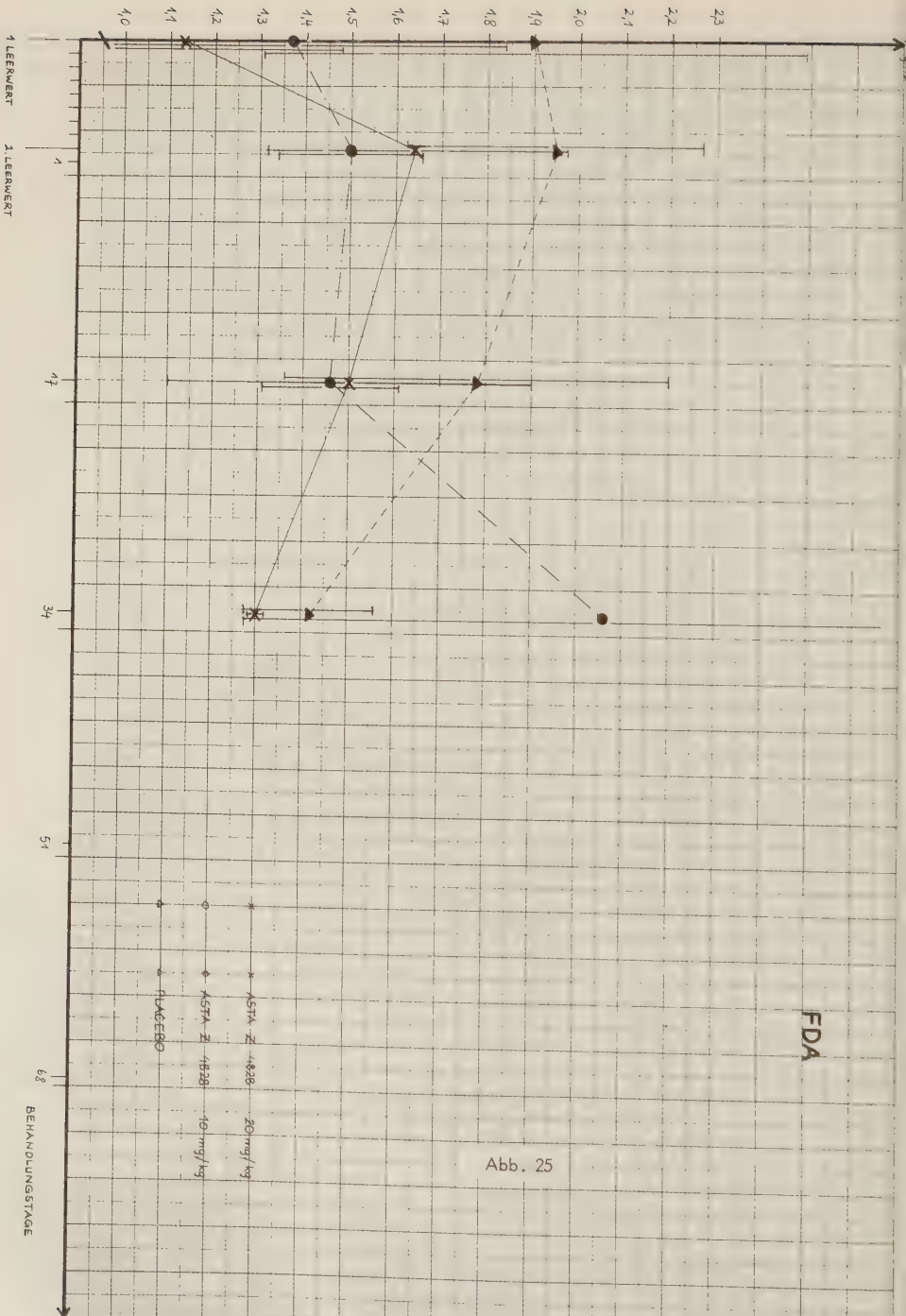
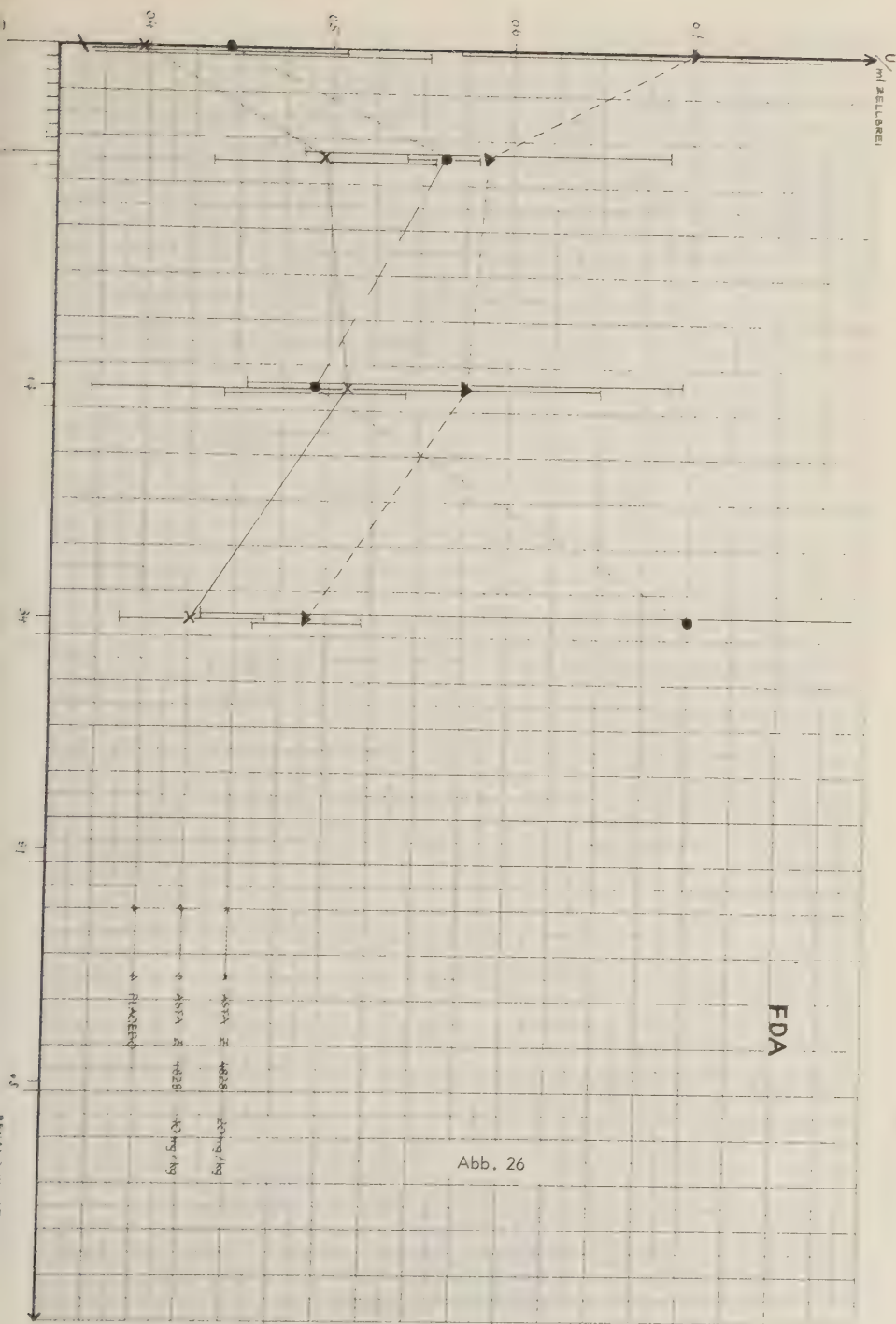
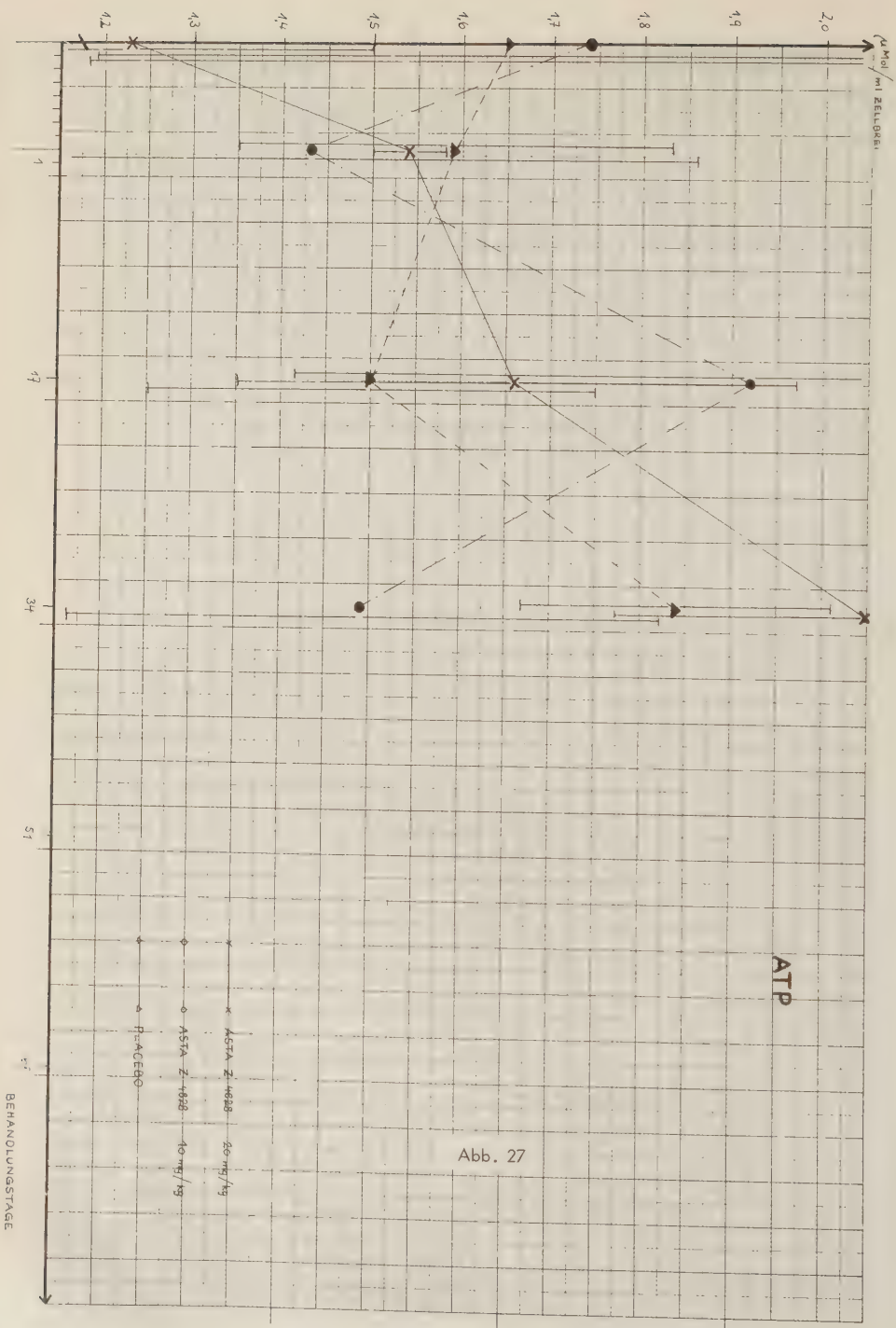


Abb. 25





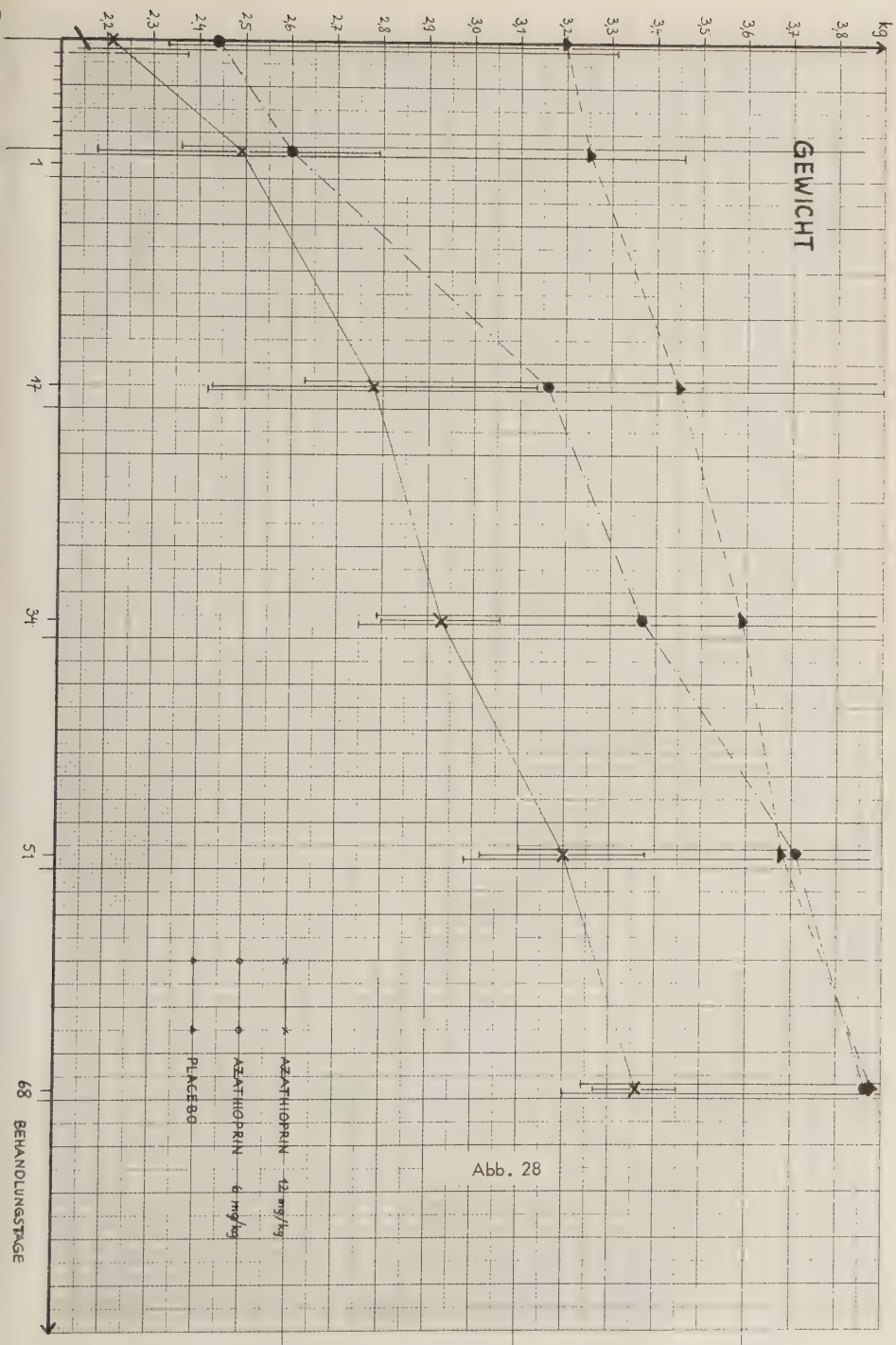


Abb. 28

ERYTHROCYTEN

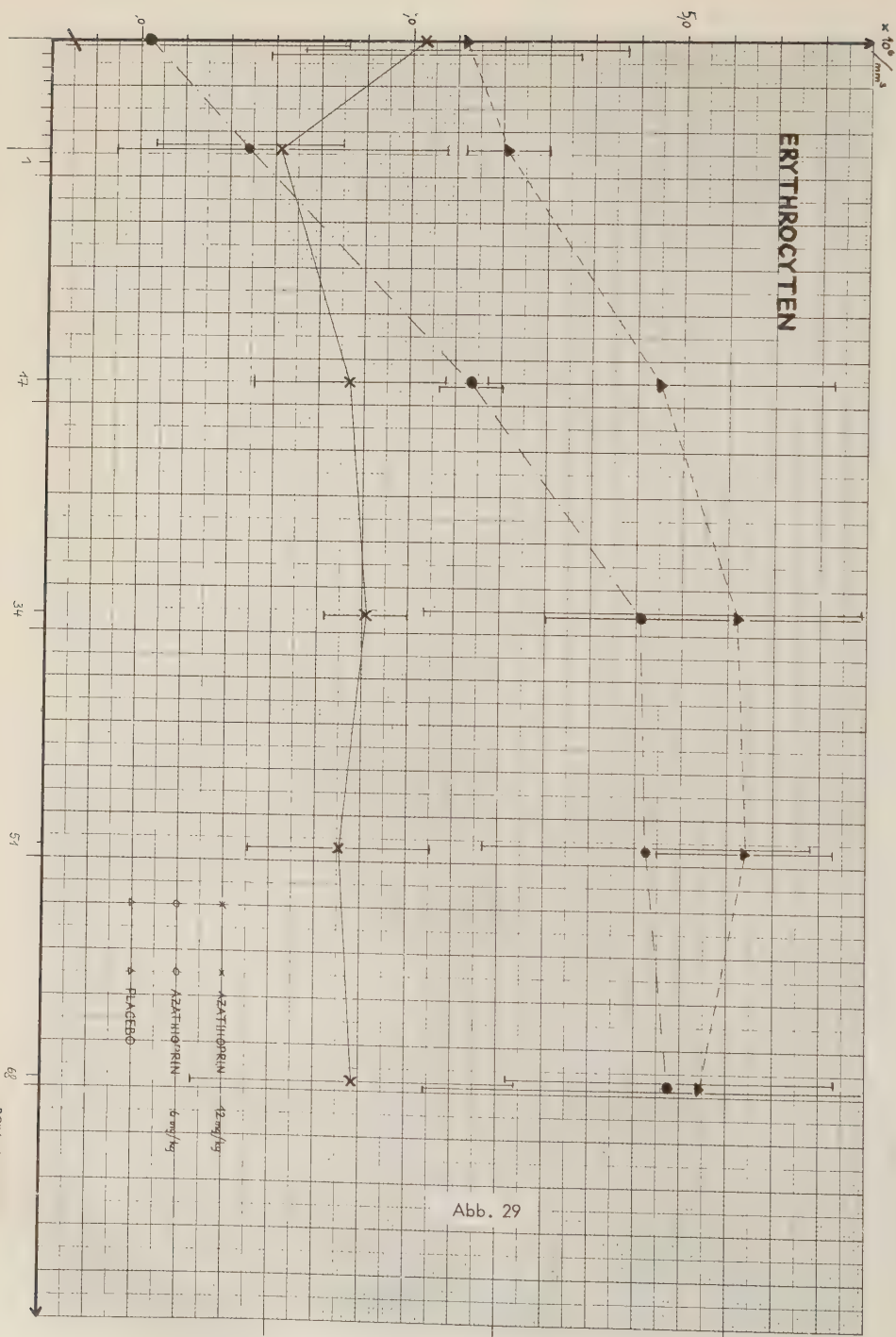


Abb. 29

HAEMOGLOBIN

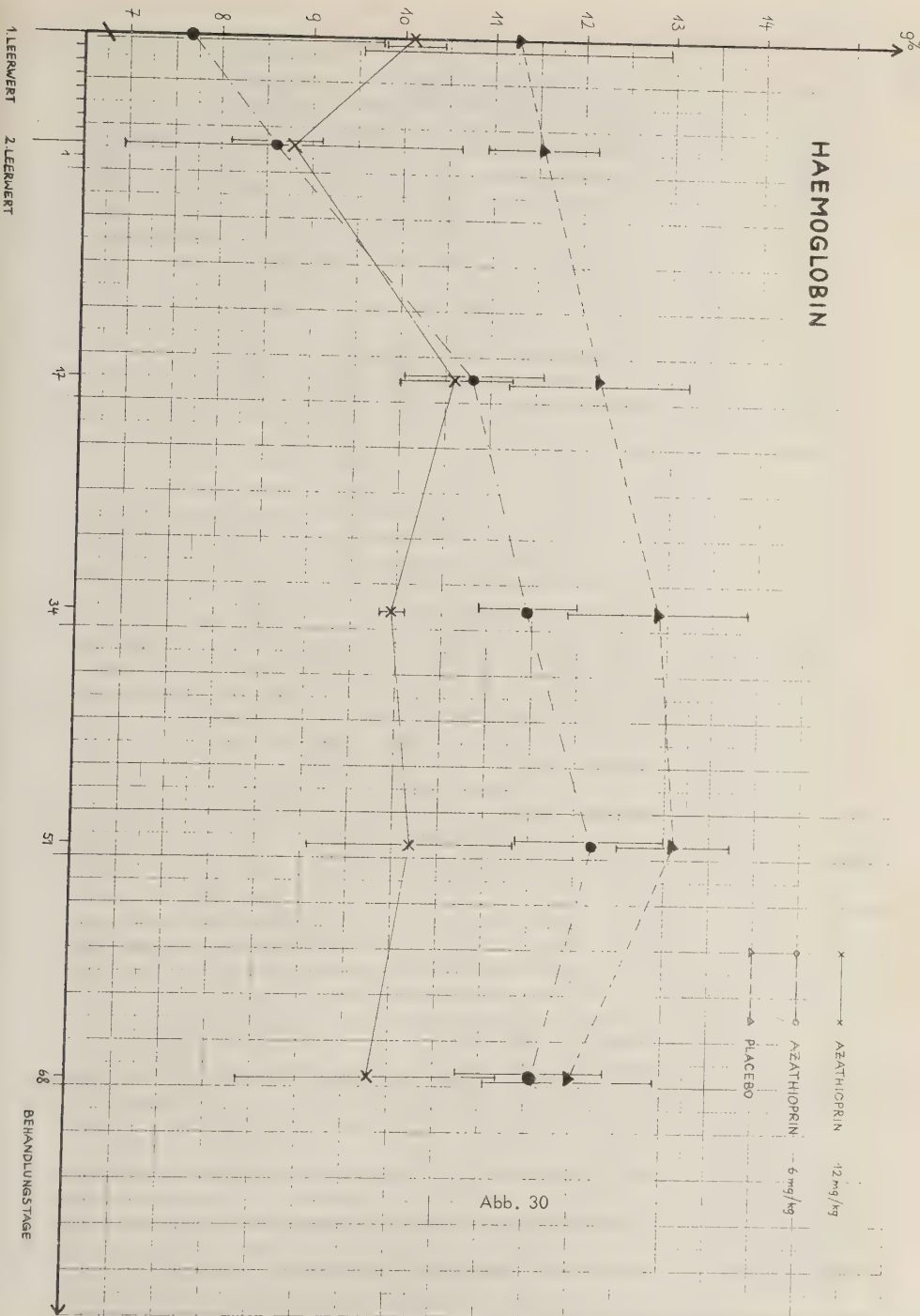


Abb. 30

1 LIEFERWERT 2 LIEFERWERT

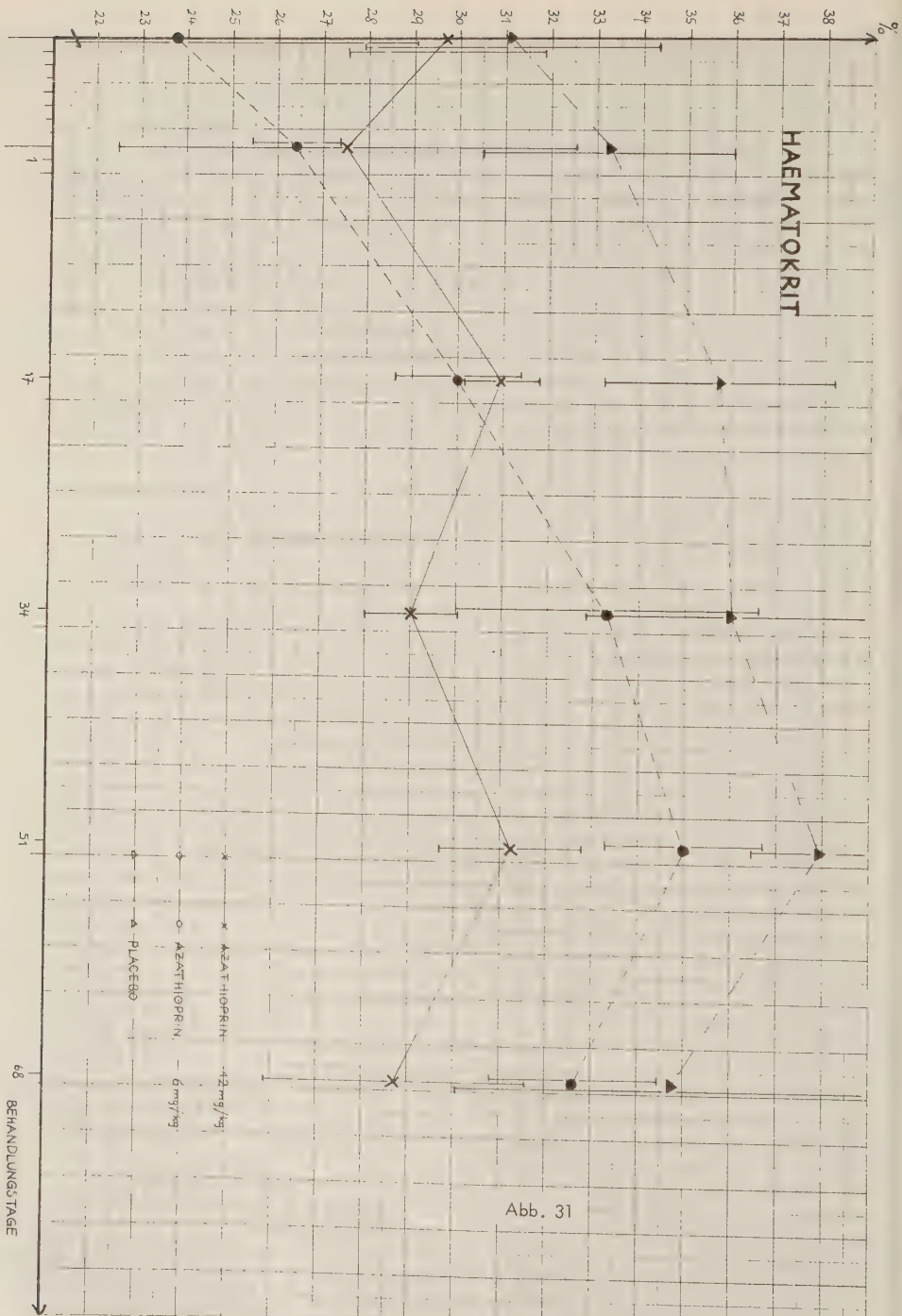


Abb. 31

1. LEERWERT 2. LEERWERT

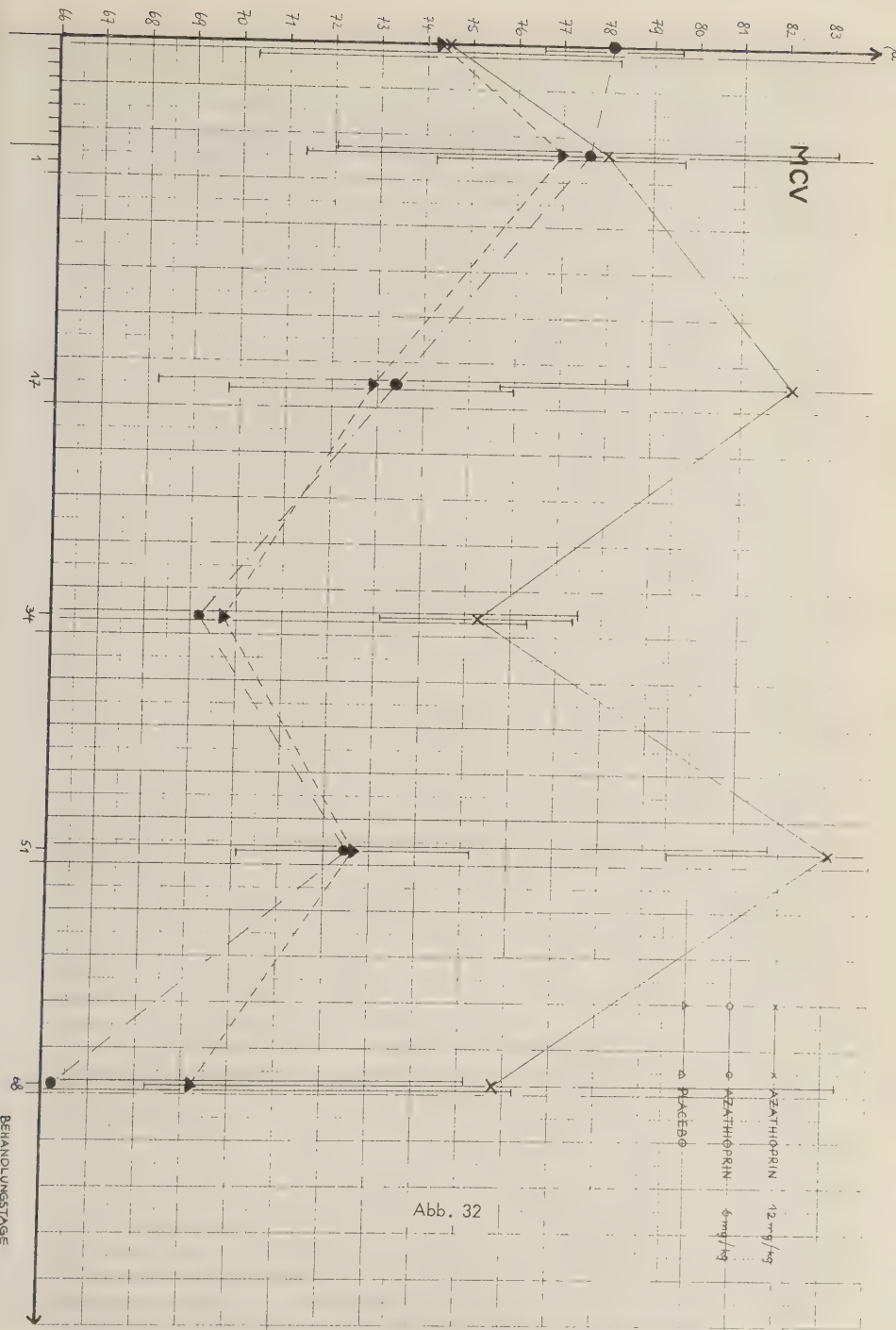


Abb. 32

NEUTROPHILE GRANULOCYTEN

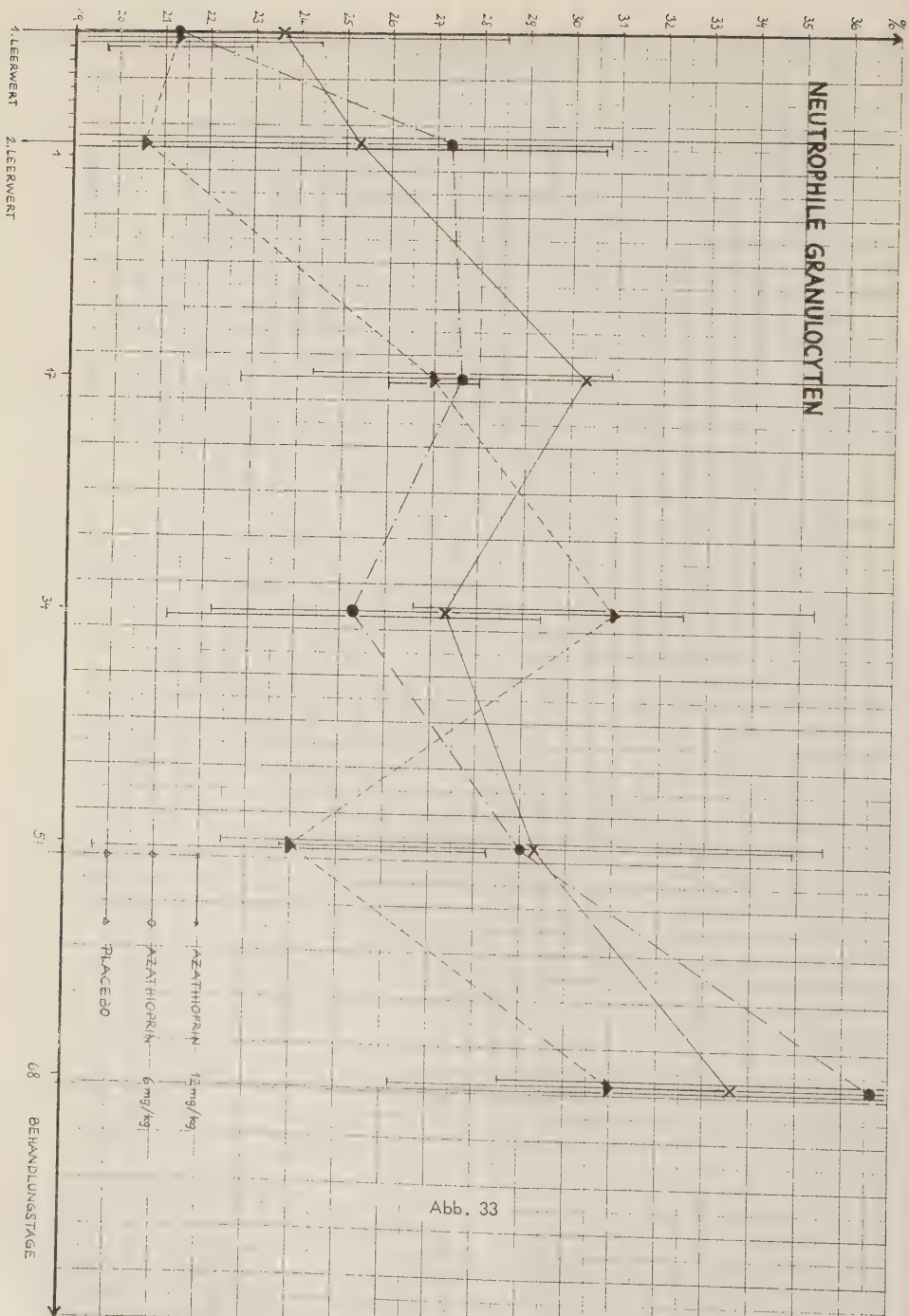


Abb. 33

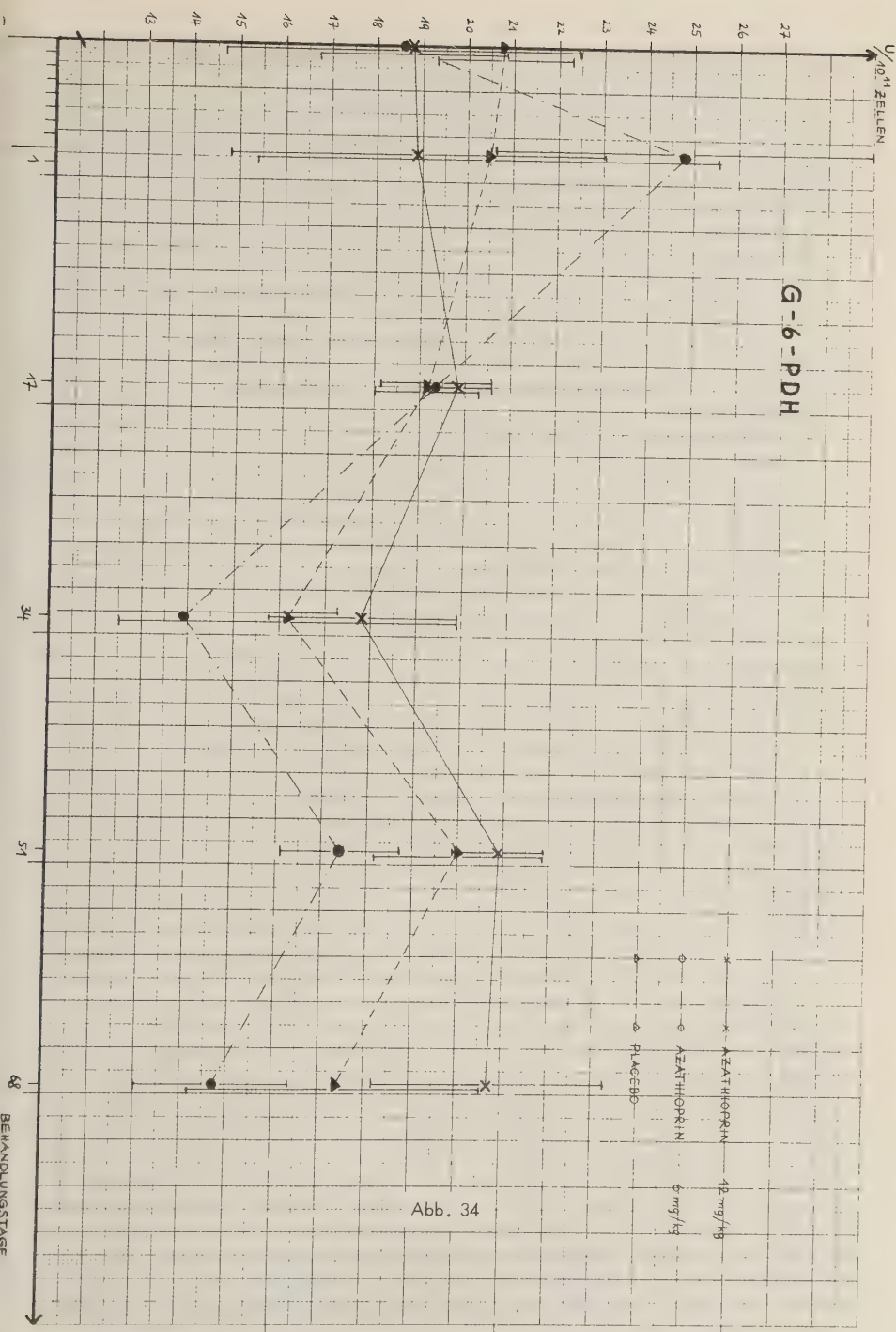


Abb. 34

BEHANDLUNGSTAGE

G-6-PDH

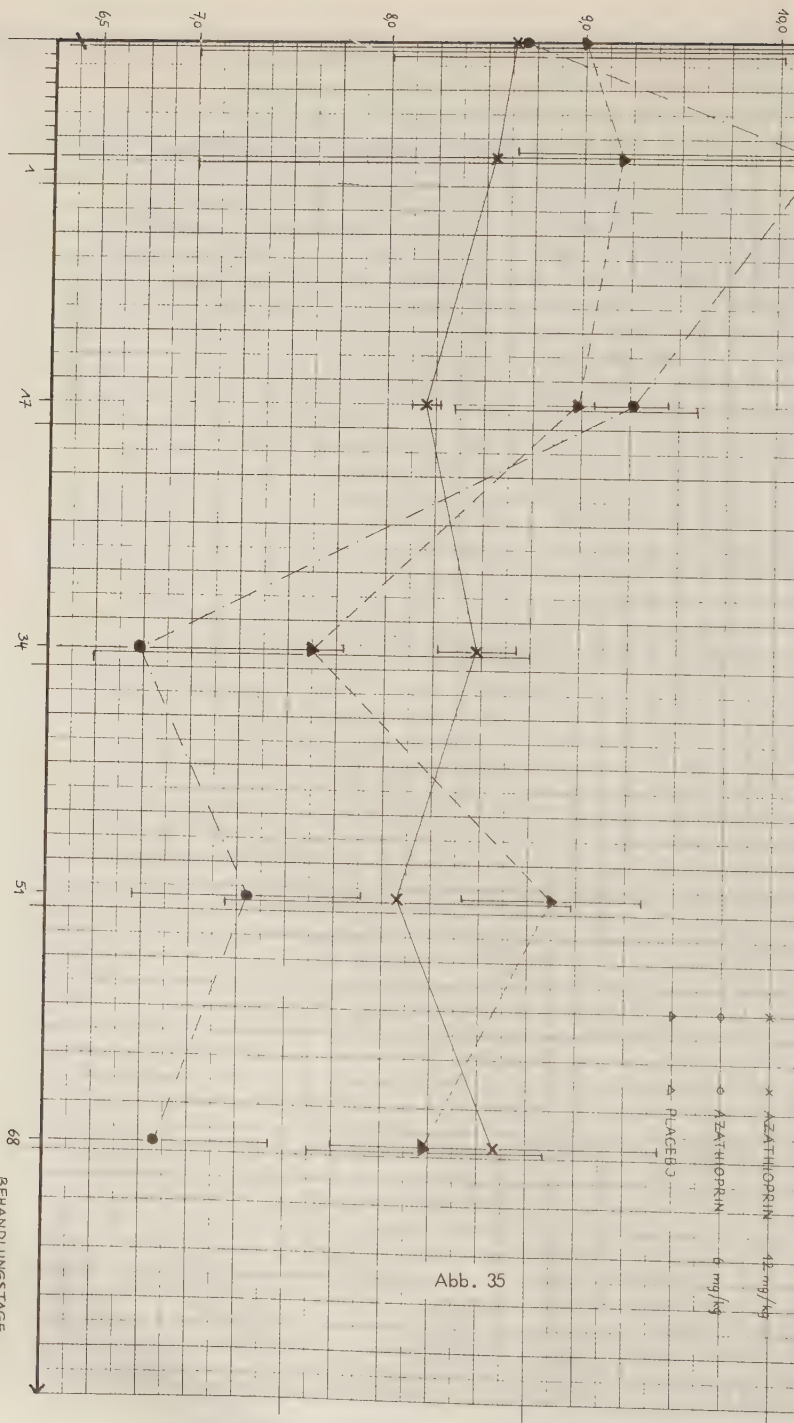
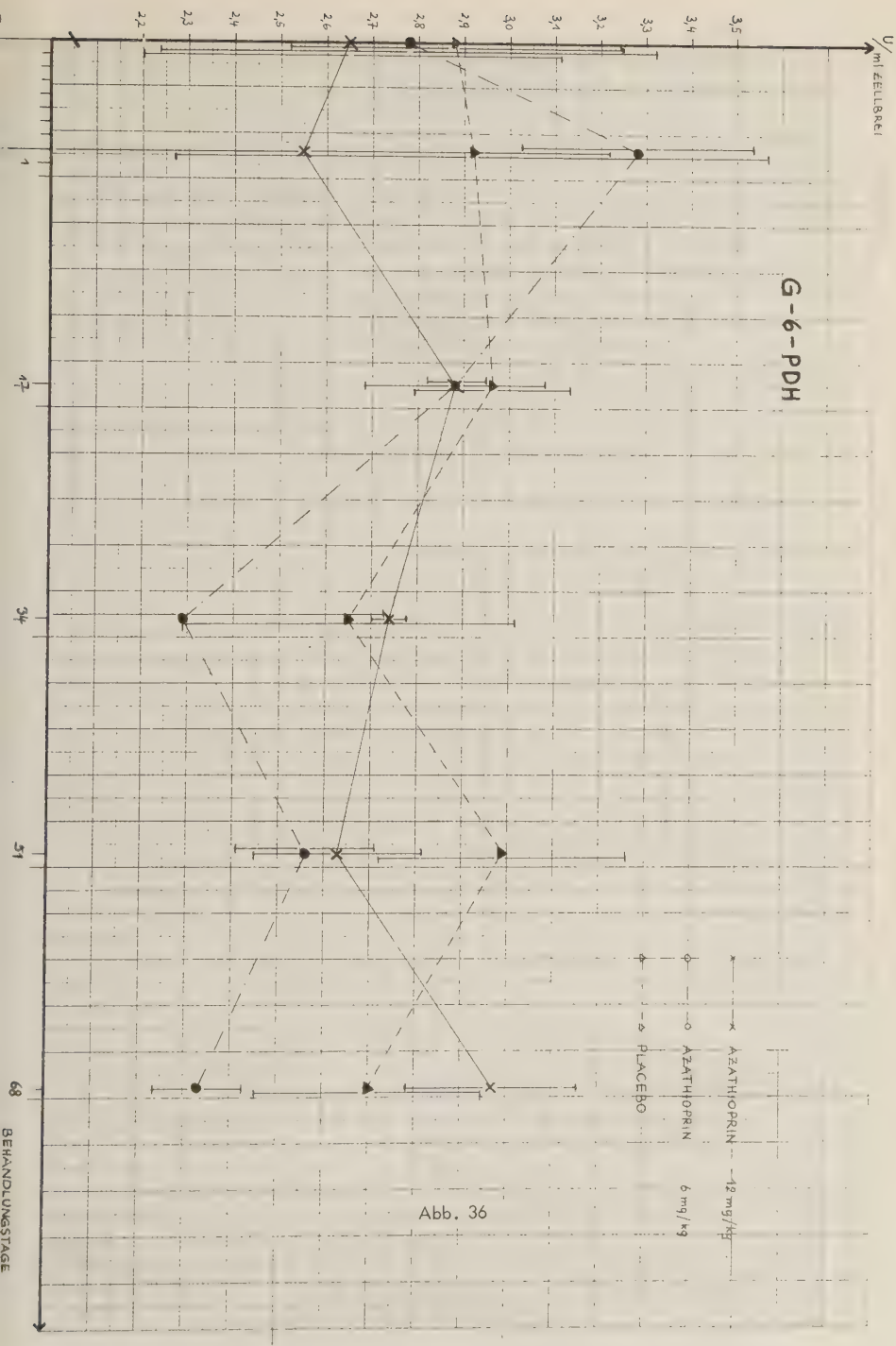


Abb. 35



6-PGDH

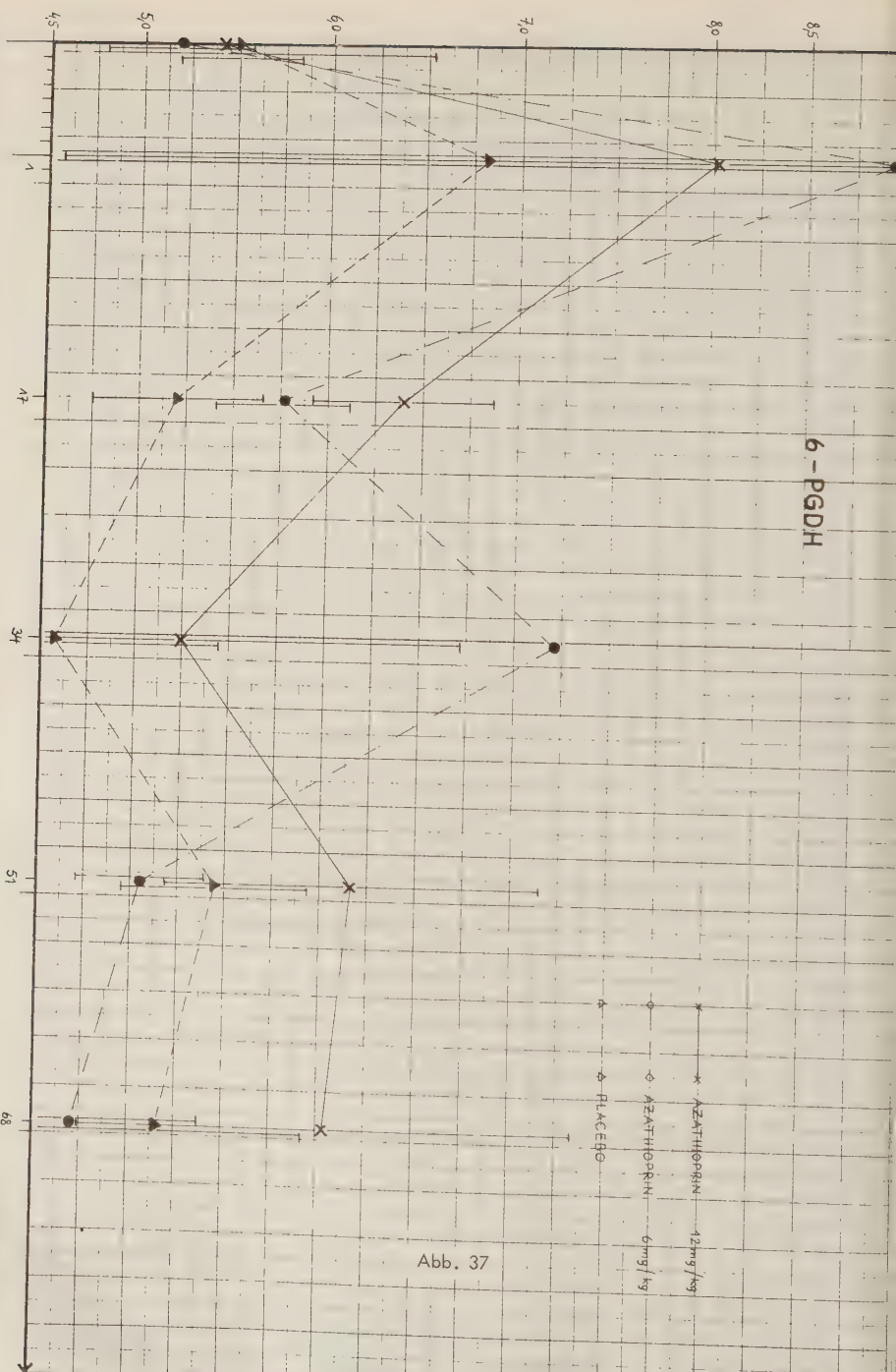


Abb. 37

1. LEERWERT 2. LEERWERT

BEHANDLUNGSTAGE

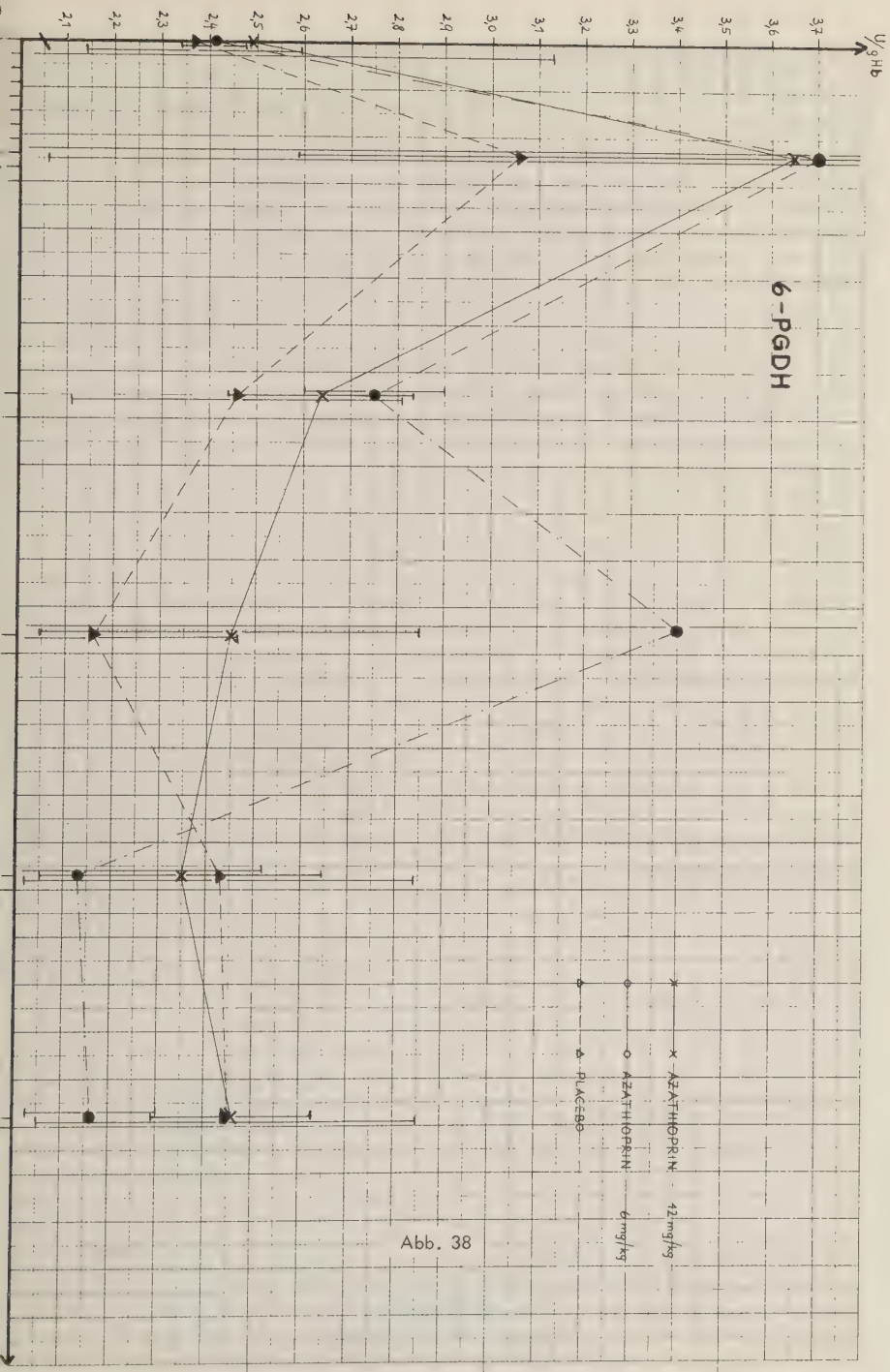
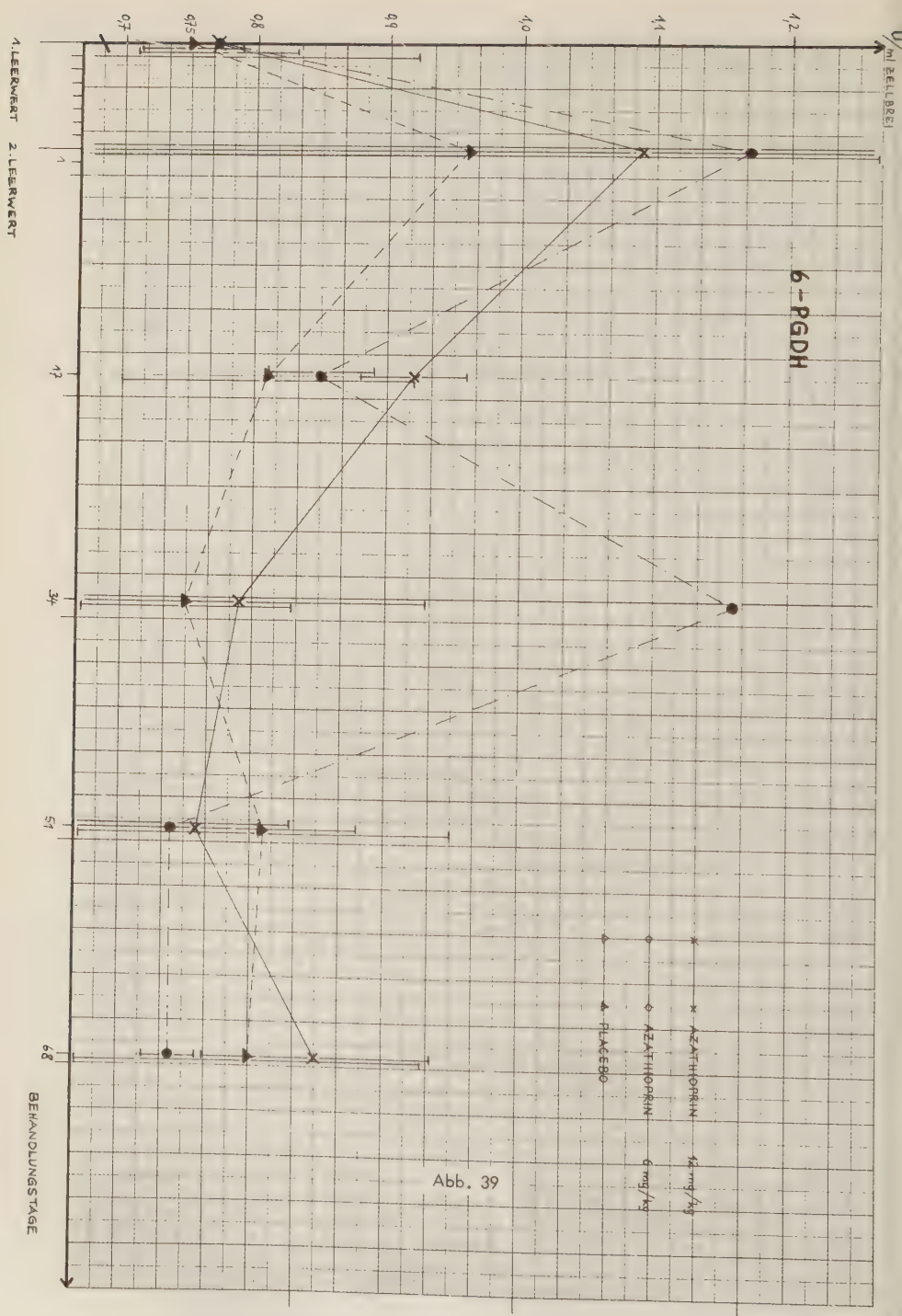


Abb. 38



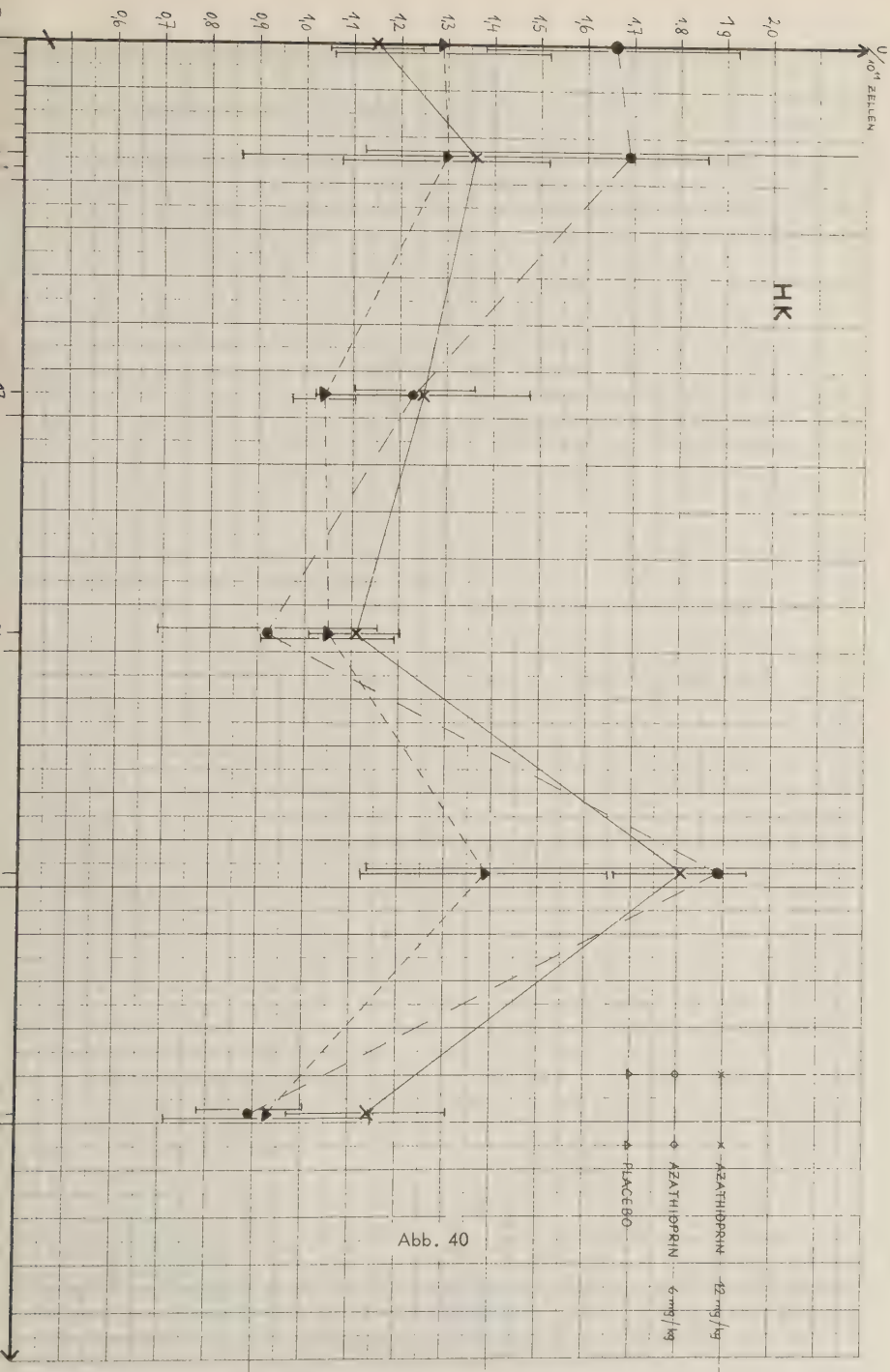


Abb. 40

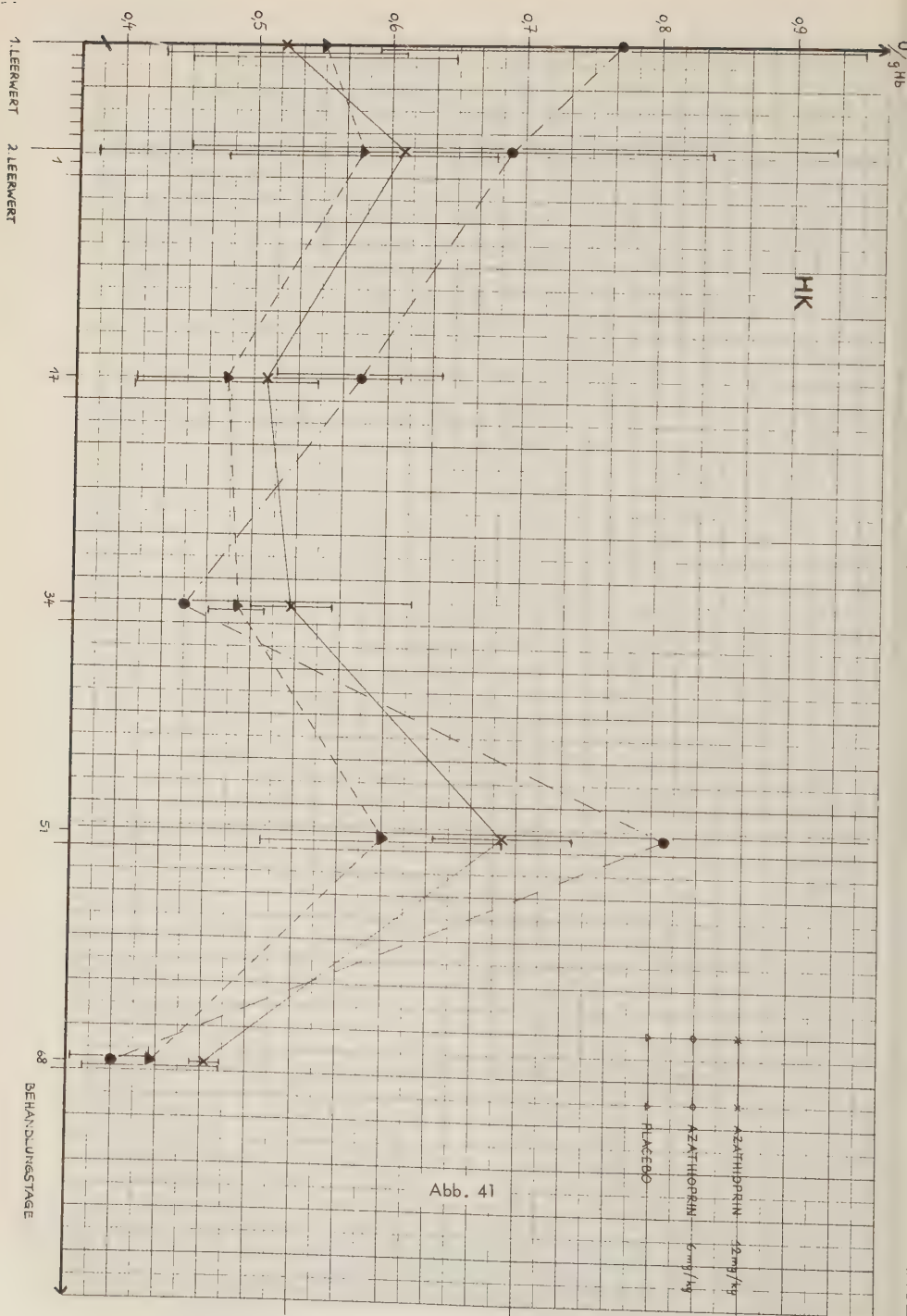


Abb. 41

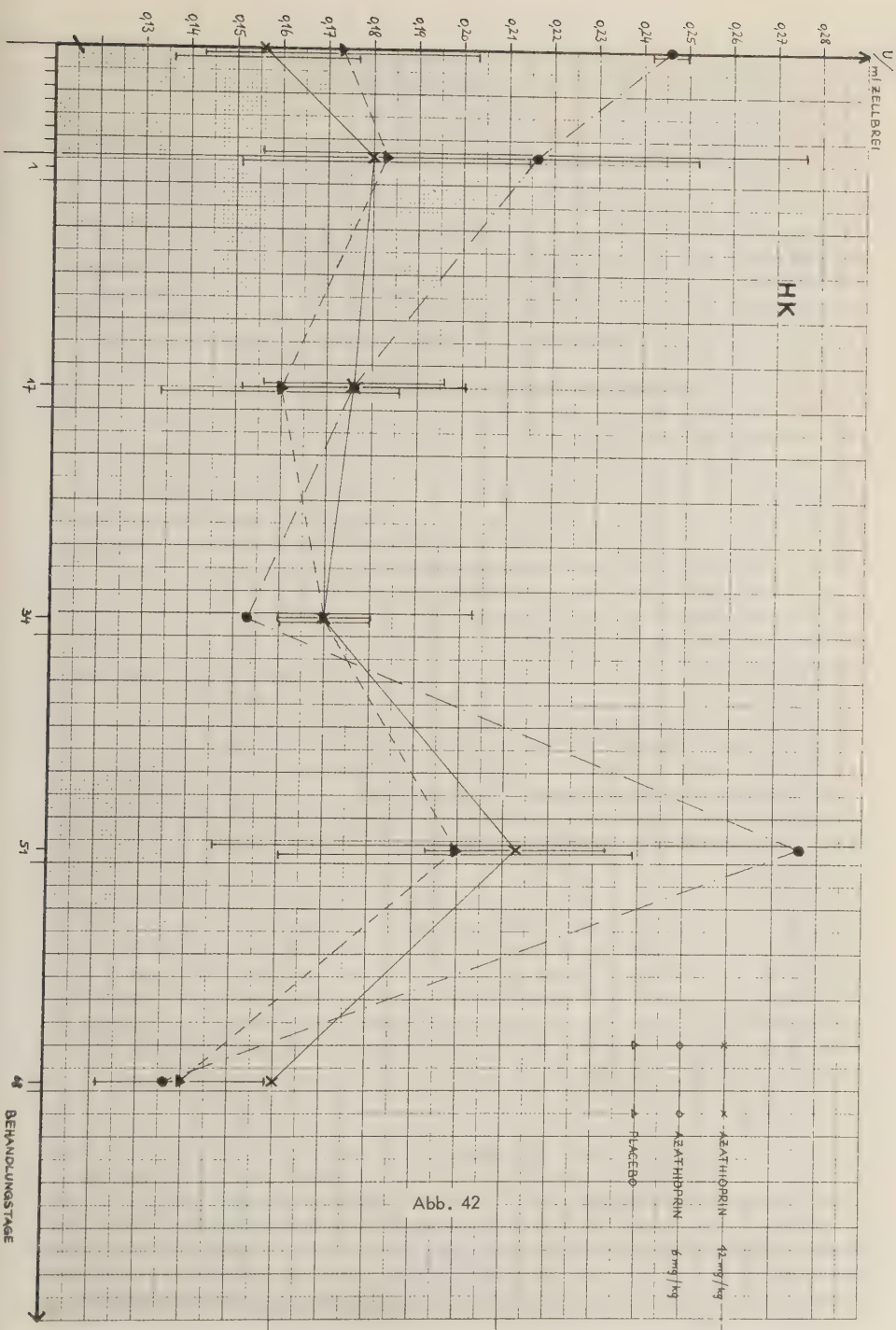


Abb. 42

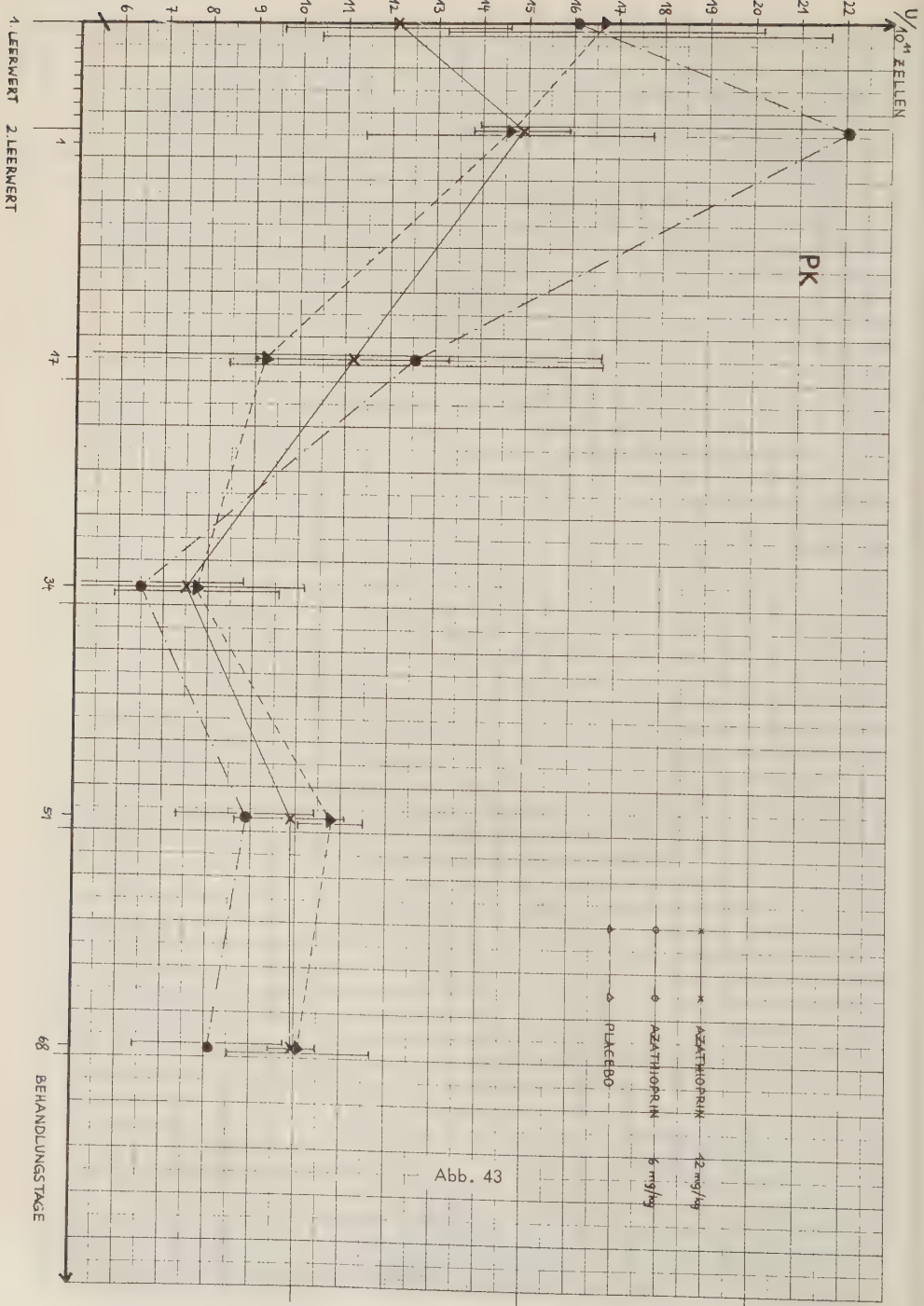
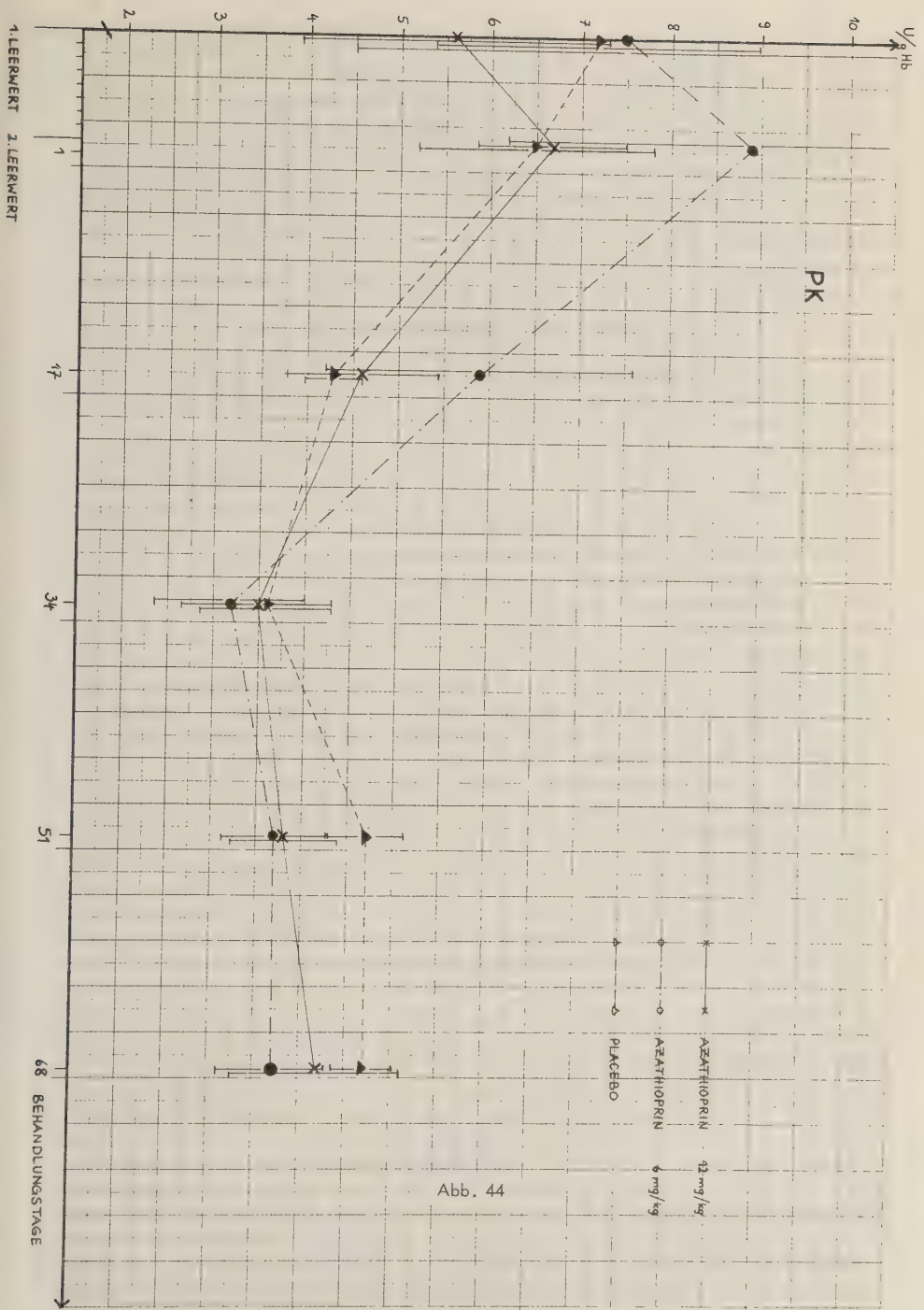
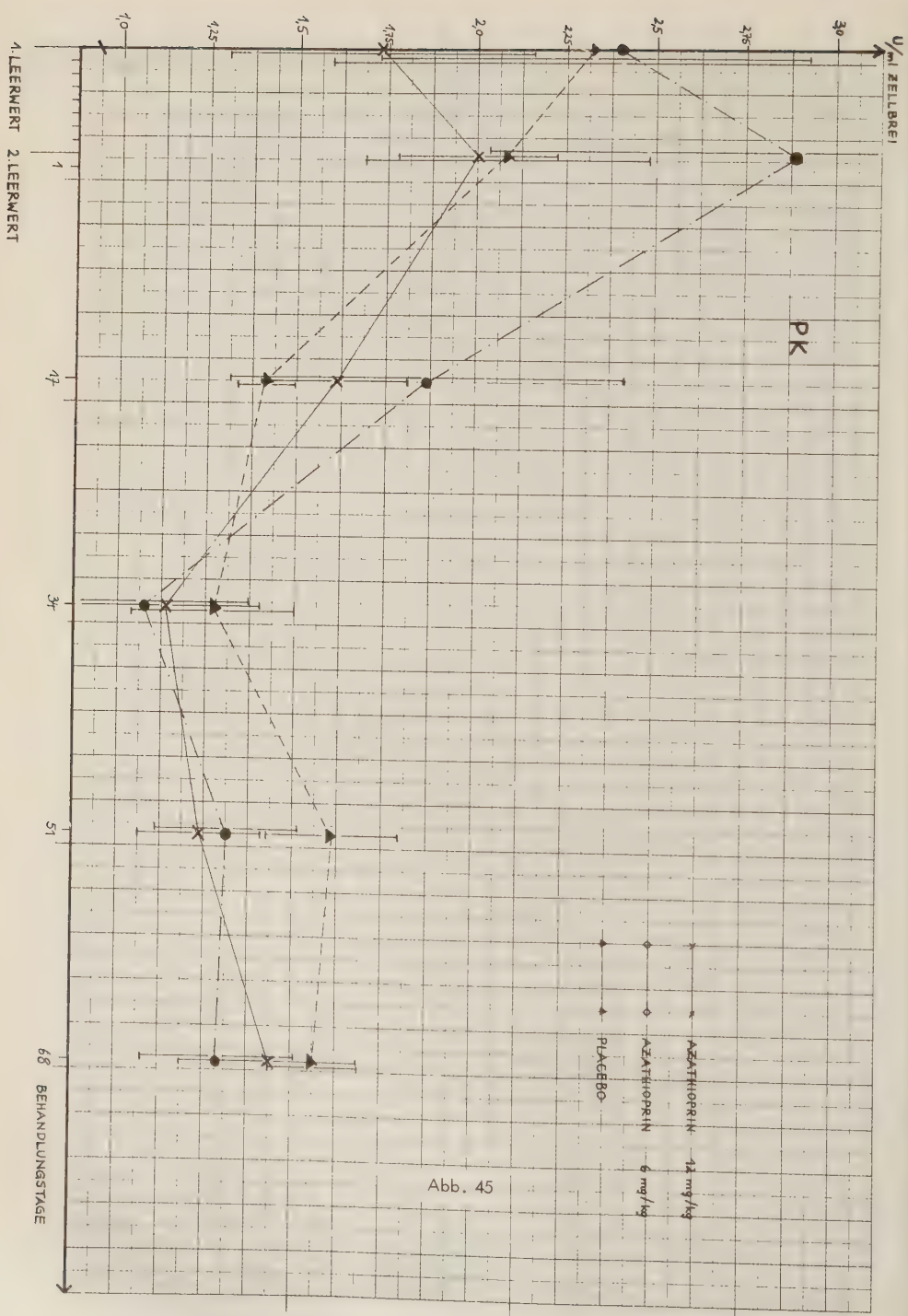
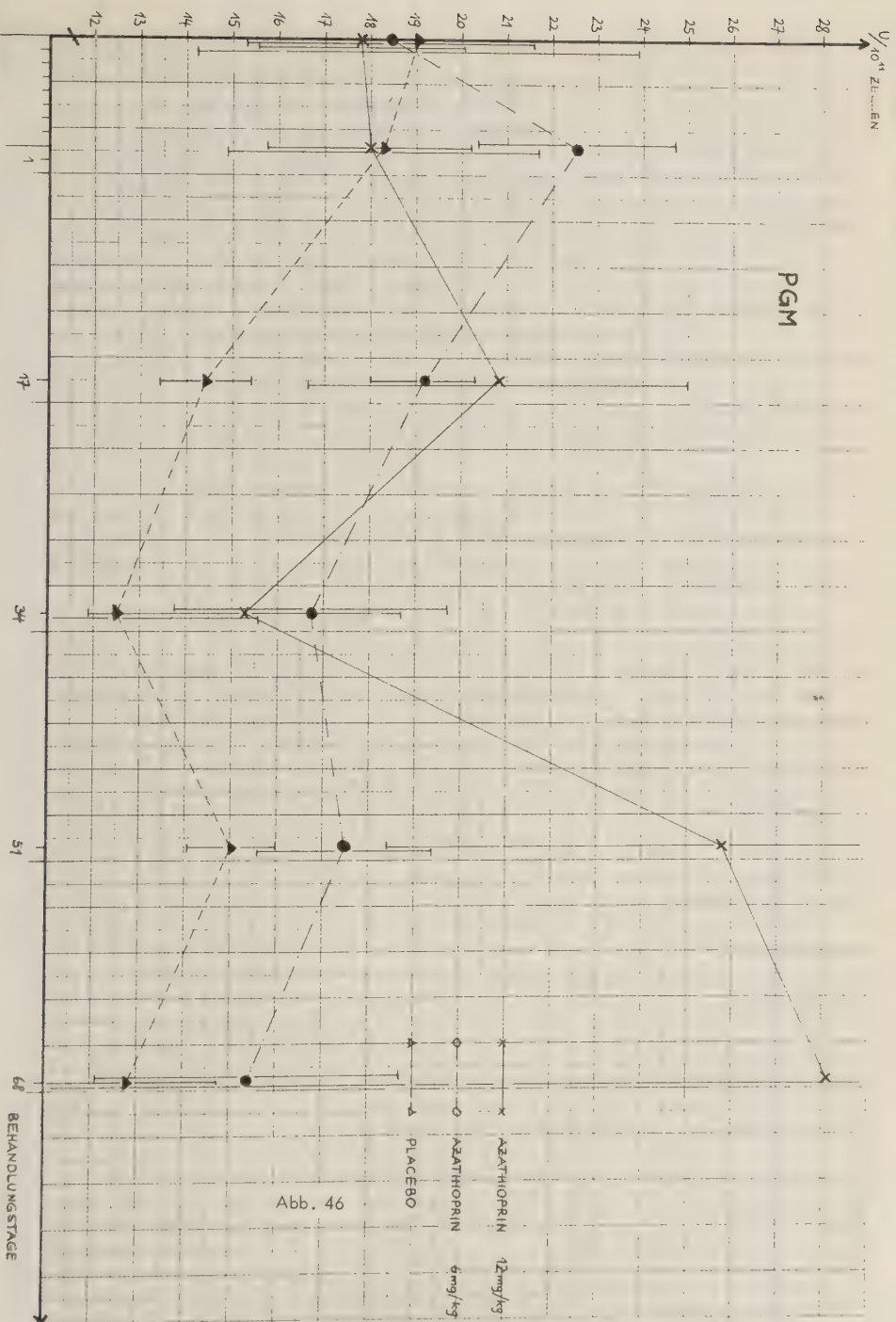


Abb. 43







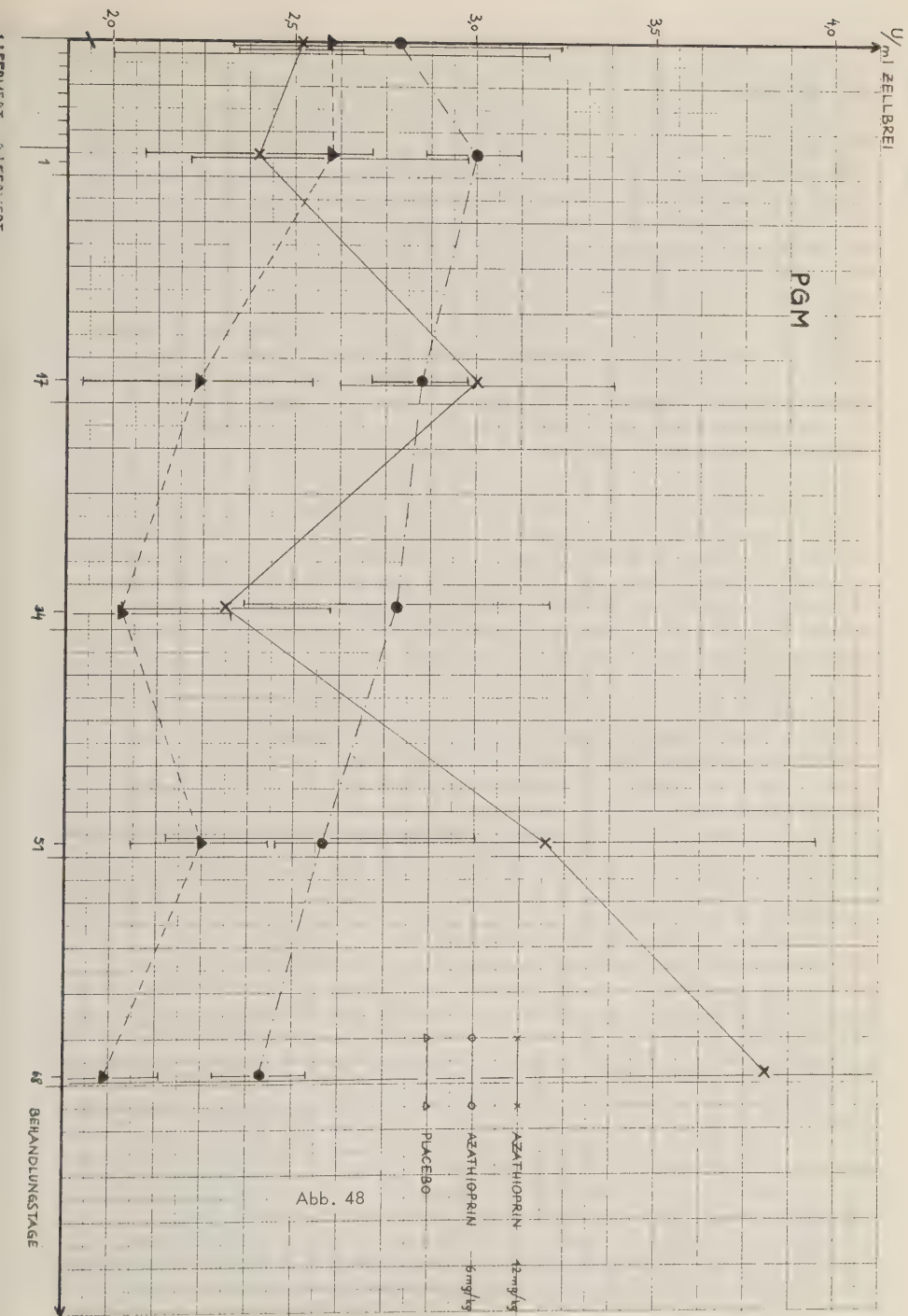


Abb. 48

1. LEEFWERT 2. LEEFWERT

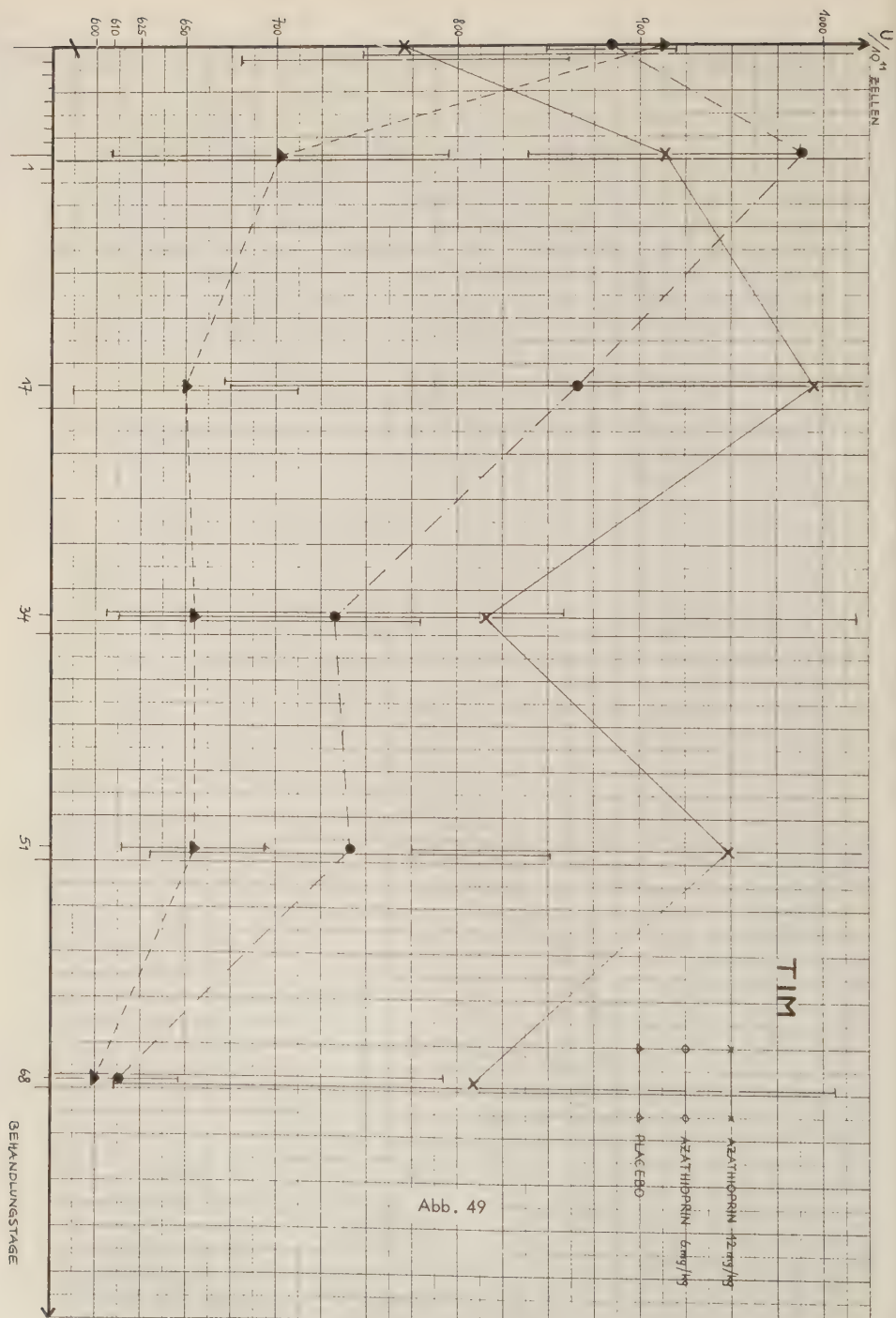


Abb. 49

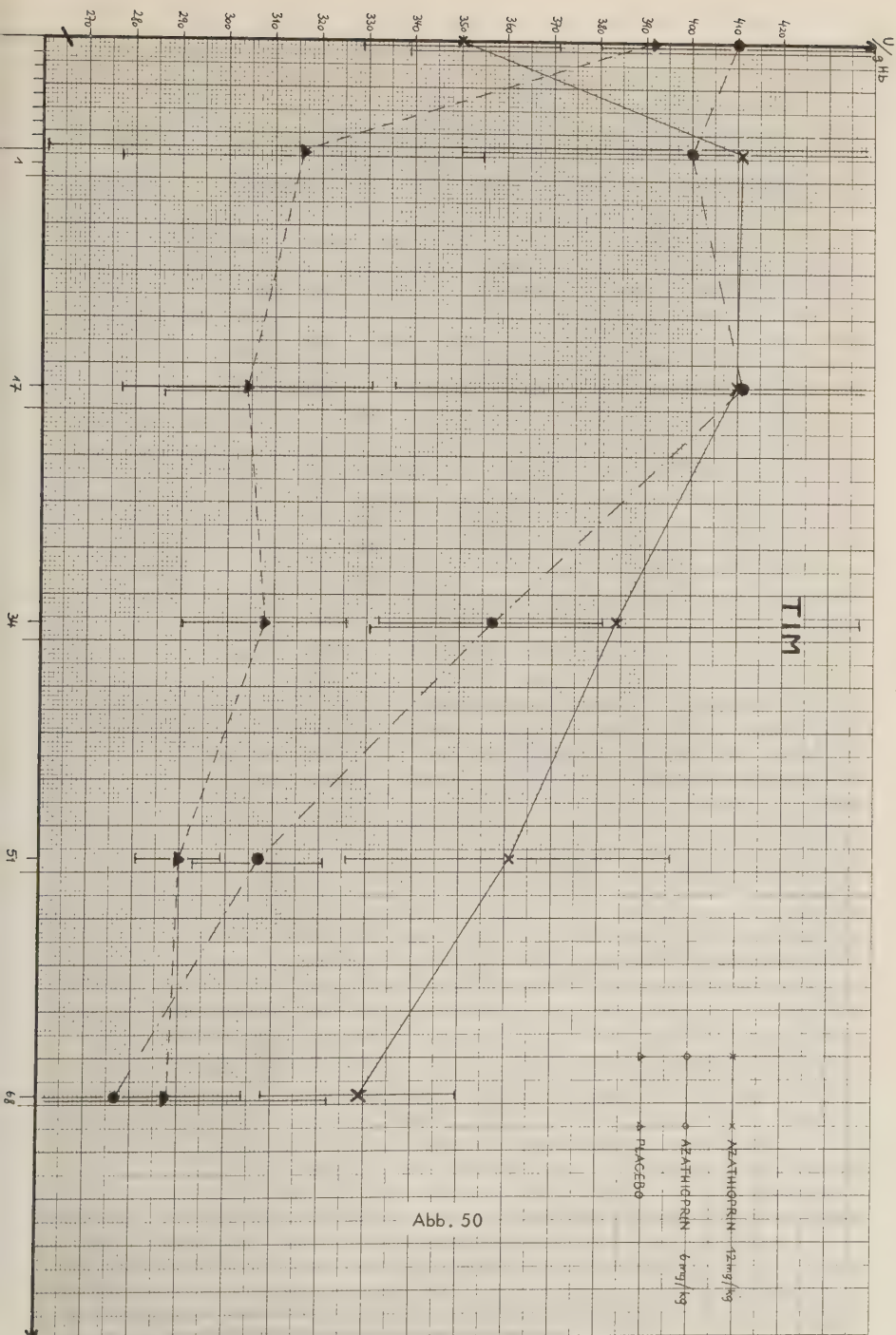


Abb. 50

1. LEERWERT 2. LEERWERT

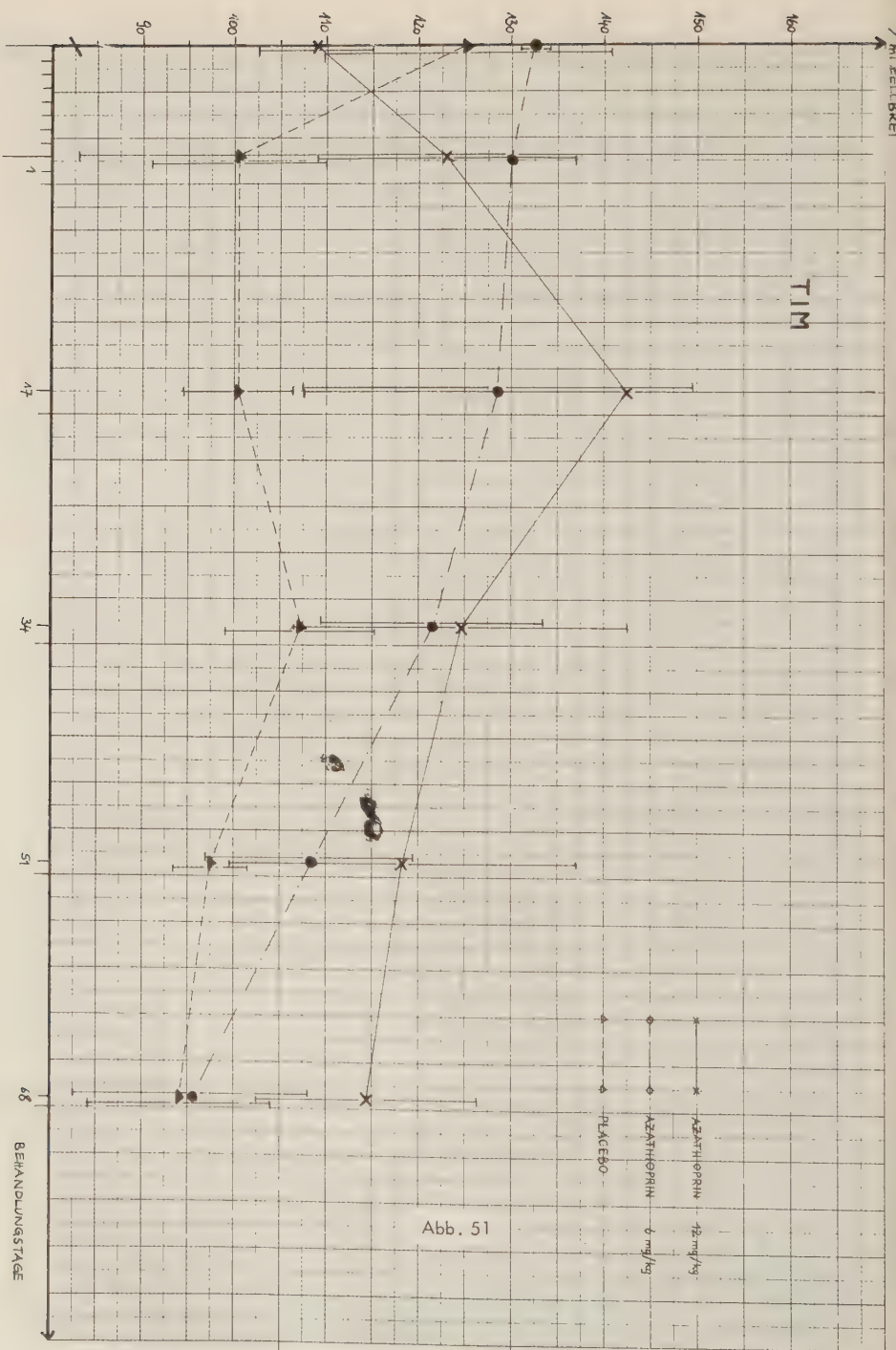
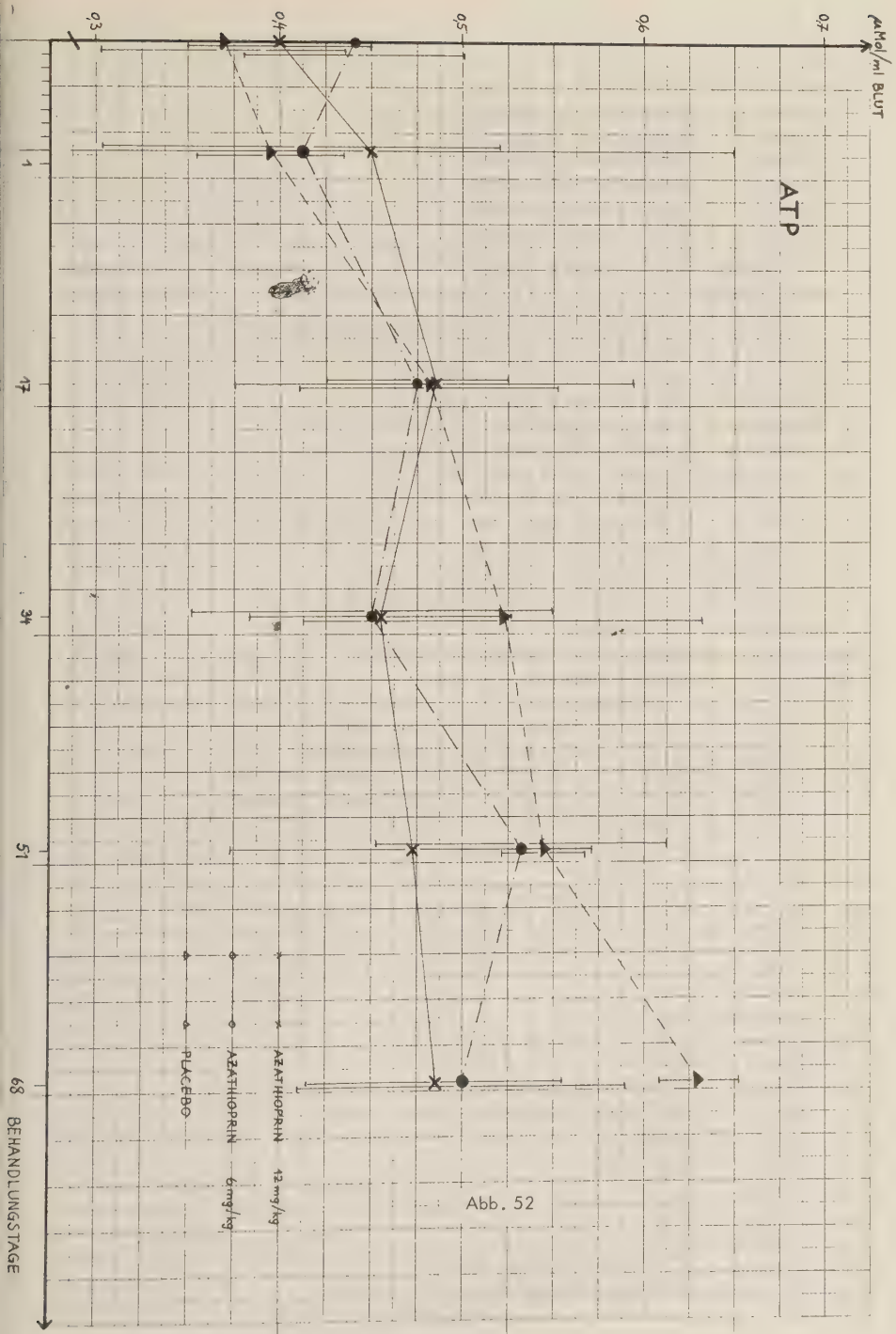


Abb. 51



Verwendete Abkürzungen

ATP	Adenosin-5 -Triphosphat
ADP	Adenosin-5 -Diphosphat
AMP	Adenosin-5 -Monophosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FDA	Fruktose-Diphosphat-Aldolase
F-1,6-diP	Fruktose-1,6-Diphosphat
GAP	Glycerinaldehyd-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GR	NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
6-PG	6-Phosphoglukonat
6-PGDH	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxydiert
3-PG	3-Phosphoglycerat
3-PGK	3-Phosphoglyceratkinase
G-2,3-P	Glycerat-2,3 -Diphosphat
GDH	Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MG	Molekulargewicht
MK	Myokinase
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, oxydiert
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat, oxydiert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat, reduziert
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGM	3-Phosphoglycerat-Mutase
PK	Pyruvatkinase
RNS	Ribonukleinsäure
TIM	Triosephosphat isomerase
TRA	Triäthanolamin-Hydrochlorid

Verwendete Maßeinheiten

g	Gramm
G	Gravitationskonstante
μg	10 ⁻¹² Gramm
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μ ³	Kubikmikrometer (= 10 ⁻⁹ mm ³)
ml	Milliliter
nm	Nanometer (= 10 ⁻⁶ mm)
U	Internationale Einheit

- ADAM, H.
-Adenosin-5-diphosphat und Adenosin-5-monophosphat. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, hrsg. v. H.U. BERGMAYER, Weinheim/Bergstr. 1962, S. 573 - 577.
- ADAM, H.
-Adenosin-5-triphosphat. Bestimmung mit Phosphoglycerat-Kinase. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, hrsg. v. H.U. BERGMAYER, Weinheim/Bergstr. 1962, S. 539 - 543.
- ALLENBACH, A. C.
-Drug employed for the suppression of immunologic responsiveness. *New Engl. J. Med.* 272 : 1114 - 1116 (1965).
- ALLISON, A. C. and G. P. B. JAY.
-Enzyme activity as a function of age in the human erythrocyte. *Brit. J. Haemat.* 1 : 291 - 303 (1955)
- d'AMBROSIO, F. und G. FONTANA-DONATI
-Allgemeine Nebenwirkungen der Cyclophosphamid-Therapie bei verschiedenen Anwendungsformen. In: III. Internat. Kongr. Chemother. 22.-27.7. 1963 Stuttgart, Verhandl. Bd. II, Thieme Verlag Stuttgart 1964, S. 1177 - 1181.
- ANDREIN, W.
-Comparative hematology. New York - London 1965, S. 142 - 143.
- ARNOLD, H.
-Über die Chemie neuer zytostatisch wirksamer N-Chloroethyl-Phosphorsäureesterdiamide. 5. Int. Kongr. Chemother., Wien 1967, Vol. II/2, S. 751 - 754
- AUGUSTIN, M., R. HACKER und G. WILKE
-Permeation und Hexokinase als Regulatoren der Glykolyse von Kaninchenerythrocyten und -retikulocyten. *Fol. haemat. (Leipzig)* 83 : 328 - 334 (1965).
- BARTHELEMI, W.
-Die Entwicklung der Enzymaktivitäten in Erythrocyten während des kindlichen Lebensalters. *Machr. Kinderheilk.* 116 : 410 - 412 (1968).
- BAUER, C. H.
-Das Kreislaufsystem. Berlin-Moscow-New York 2. Aufl. 1963, S. 755 - 834.
- BECKMANN, H.
-Klinische Haematologie. Stuttgart 1970
- BECKENHÖRZ, G.
-Triosephosphate isomerase from calf muscle. In: *Methods in enzymology*, hrsg. v. S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN, Vol. 1, New York 1955, S. 387 - 391.

- BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE,
R. CZOK, K. H. GARBADE,
E. MEYER-ARENDT,
G. PFLEIDERER -Diphosphofructaldolase, Phosphoglyceraldehyd-
dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase
Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-
Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeits-
gang. Z. Naturforsch. Tübingen 8 b : 555 - 577
(1953).
- BENJAMIN, H. -Endoxan^R bei der Behandlung maligner Krankheiten
ein überarbeitetes Dosierungsschema. Med. Proc.
(Südafrika) 9 : 412 - 414 (1963)
- BERGMEYER, H. U. -Grundlagen der enzymatischen Analyse. In:
Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. v.
H. U. BERGMEYER, Weinheim/Bergstr. 1962,
S. 3 - 42.
- BERNSTEIN, R. E. -Alterations in metabolic energetics and cation
transport during aging of red cells. J. Clin. Invest.
38 : 1572 - 1586 (1959).
- BETKE, K. und W. SAVELSBERG -Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung
mittels Cyanhämoglobin. Biochem. Z. 320 : 431 -
439 (1950).
- BEUTLER, E. -In vitro studies of the stability of red cell
glutathione a new test for drug-sensitivity. J. Clin.
Invest. 35 : 690 (1956).
- BEUTLER, E. -The glutathione instability of drug-sensitive red
cells, a new method for the in vitro detection of
drug sensitivity. J. Lab. Clin. Med. 49 : 84
(1957).
- BEUTLER, E. -Hereditary disorders of erythrocyte metabolism.
New York - London 1967.
- BEUTLER, E., R. J. DERN and
A. S. ALVING -The hemolytic effect of primaquine. III. A study
of primaquine sensitive erythrocytes. J. Lab. Clin.
Med. 44 : 177 - 184 (1954).
- BEUTLER, E., R. J. DERN and
A. S. ALVING -The hemolytic effect of primaquine. IV. The
relationship of cell age to hemolysis. J. Clin.
Med. 439 - 442 (1954).
- BEUTLER, E., R. J. DERN and
A. S. ALVING -The hemolytic effect of primaquine. VI. An in
vitro test for sensitivity of erythrocytes to
primaquine. J. Lab. Clin. Med. 45 : 40 - 50
(1955).

- BEUTLER, E., R. J. DERN, C. L. FLANAGAN and A. S. ALVING -The hemolytic effect of primaquine. VII. Biochemical studies in drug sensitive erythrocytes. J. Lab. Clin. Med. 45 : 286 - 295 (1955).
- BEUTLER, E. and M. K. Y. Yeh -Erythrocyte glutathione reductase. Blood 21 : 573 - 585 (1963).
- BISHOP, C. and D. M. SURGENOR -The red blood cell. New York 1964.
- BLÄKER, F., K. H. SCHÄFER und H. WALLIS -Neuere Erkenntnisse über Vorkommen, Ätiologie, Pathogenese und Therapie der Colitis ulcerosa im Kindesalter (Erste Erfahrungen mit der immunsuppressiven Behandlung). Mschr. Kinderheilk. 117 : 52 - 56 (1959).
- BLUM, K. U. -Enzymopathologie der Blutzelle. Blut Z. für Blutforschung VIII : 239 - 252 (1962).
- BOCK, H. E. -Komplikationen der Langzeittherapie mit besonderem Blick auf Karzinostatika. Landarzt 41 : 952 - 956 (1965).
- BOCK, H. E., O. KARGES, G. W. LÖHR und H. D. WALLER -Fermenteigenschaften roter Blutzellen bei Lebererkrankungen. Klin. Wschr. 36 : 56 - 63 (1958).
- BOCK, H. E., H. D. WALLER, G. W. LÖHR und O. KARGES -Besonderheiten im Fermentgehalt von Megalocyten. Klin. Wschr. 36, : 151 - 157 (1958).
- BOLT, W. F. RITZL, R. TOUSSAINT und G. ZERLETT -Der Diphosphopyridinnucleotid-Blutspiegel als Kriterium für eine gesteuerte Dosierung der Cytostatika E 39 und Endoxan^R bei inoperablen Tumorkranken. Klin. Wschr. 38 : 71 - 74 (1960).
- BRICHTA, G. und E. E. REIMER -Über Erythroblastenkernveränderungen unter Zyklophosphamidtherapie. Wien Z. inn. Med. 47 : 154 - 159 (1966).
- BROCK, N. -Pharmakologische Untersuchungen mit neuen N-Chloräthyl-Phosphorsäureester-Diamiden. 5. Int. Kongr. Chemother., Wien 1967, Vol. II/1, S. 155 - 161.
- BROWN, G. B. -The biosynthesis of nucleic acids as a basis for an approach to chemotherapy. Ann. N. Y. Acad. Sc. 60 : 185 - 194 (1954).
- BÜCHER, Th., W. LUH und D. PETTE -Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. In: HOPPE-SEYLER/THIER-FELDER Handbuch der physiologisch- und pathologischen Analyse, hrsg. von K. LANG und E. LEHNARTZ, Bd. 6, Teil A, 10. Aufl. Berlin-Heidelberg - New York 1964, S. 292 - 339.

- IV -

- BÜCHERL, E. S., R. EISELE,
K. KÖHN, M. NASSERI und
W. ZUSCHNEID -Über die Beeinflussung der Toleranz bei Lungen-
transplantation durch Behandlung mit Imuran^R.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 315 : 126 - 134
(1966).
- BURCHENAL, J. H., R.R. ELLISON, -Clinical studies on 6-mercaptopurine. Ann. N. Y.
M. L. MURPHY, D. A. KARNOFSKY, Acad. Sc. 60 : 359 - 368 (1954).
N. P. SYKES, T. C. TAN,
A. C. MERMANN, M. YUCEOGLU,
W. P. L. MYERS, I. KRAKOFF and
N. ALBERSTADT
- BURCHENAL, J. H., D. A. -Effects of 6-mercaptopurine in man. Proc. Amer.
KARNOFSKY, L. MURPHY, Ass. Cancer Res. 1 : 7 - 8 (1953).
R. R. ELLISON and C. P. RHODAS
- BURK, D. -Über die Begründung einer Chemotherapie des
Krebsses auf der Grundlage einer primären
Hemmung der Glucosephosphorylierung (Hexokinase-
Reaktion) durch Beeinflussung von Substrat,
Coenzym und Enzym. Klin. Wschr. 35 : 1102 -
1105 (1957).
- BUSCH, D. -Stoffwechseluntersuchungen bei einer Familie mit
3 Fällen von kongenitaler nichtsphärozytärer
hämolytischer Anämie mit Pyruvatkinase-Mangel.
Folia Haemat. N. F. 9 : 375 - 383 (1964).
- BUSCH, D. -Congenitale nichtspärocytäre hämolytische Anämie
mit Mangel an erythrocytärer Pyruvatkinase.
Folia Haemat. N. F. 9 : 89 - 118 (1964).
- BUSCH, D. -Die Biochemie des Erythrocyten mit Ausnahme des
Hämoglobinstoffwechsels. In: Handbuch der
Inneren Medizin, Bd. II/1, hrsg. v. L. HEIL-
MEYER, Berlin-Heidelberg-New York 1968,
S. 585 - 622.
- BUSCH, D. -Hereditäre nichtsphärocytäre hämolytische Anämien.
In: Handbuch der Inneren Medizin, Bd. II/2, hrsg.
von L. HEILMEYER, Berlin-Heidelberg-New York
1970, S. 294 - 334.
- BUSCH, D. unter Mitarbeit von K. SCHMUCK -Probleme des Erythrocytenstoffwechsels bei
Anämien mit Pyruvatkinasemangel. Fol. haemat.
(Leipzig) 83 : 395 - 406 (1965).
- CALNE, R. Y. -Inhibition of the rejection of renal homografts in
dogs by purine analogs. Transplant. Bull. 28 :
65 - 81 (1961).

- CARSON, P. E., G. J. BREWER
and C. ICKES
-Decreased glutathione reductase with
susceptibility to hemolysis. J. Lab. Clin. Med. 58 : 804 (1961).
- CARSON, P. E.
C. L. FLANAGAN, C. E. ICKES,
and A. S. ALVING
-Enzymatic deficiency in primaquine sensitive
erythrocytes. Science 124 : 484 - 485 (1956).
- CAVALLI-SFORZA, L.
-Grundbegriffe der Biometrie. Stuttgart 1964.
- CHAPMAN, R. G.
-Erythrocyte metabolism. J. Clin. Invest. 41 :
1249 - 1256 (1962).
- CLARKE, D. A., F. S. PHILIPS,
S. S. STERNBERG, C. C. STOCK,
G. B. ELION and
G. H. HITCHINGS
-6-Mercaptopurine: Effects in mouse sarkoma 180
and in normal animals. Cancer Res. 13 : 593 -
604 (1953).
- DAN, S., B. SARI, S. KIRILLINA
and A. KISS
-Erythrocyte enzymes in hepatogenic anemia. Acta
Medica Hung. 25 : 33 - 50 (1968).
- DELBRÜCK, A., E. ZEBE und
TH. BÜCHER
-Über Verteilungsmuster von Enzymen des energie-
liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprung-
muskel und Fettkörper von Locusta migratoria
und ihre cytologische Zuordnung. Biochem. Z.
331 : 273 - 296 (1959).
- DERN, R. J., E. BEUTLER and
A. S. ALVING
-The hemolytic effect of primaquine. II. The
natural course of hemolytic anemia and the
mechanism of its self limited character. J. Lab.
Clin. Med. 44 : 171 - 176 (1954).
- DERN, R. J., E. BEUTLER and
A. S. ALVING
-The hemolytic effect of primaquine. V. Primaquine
sensitivity as a manifestation of multiple drug
sensitivity. J. Lab. Clin. Med. 45 : 30 - 39 (1955)
- DICKENS, F.
-Oxidation of phosphohexonate and pentose
phosphoric acids by yeast enzymes. I. Oxidation of
phosphohexonate. II. Oxidation of pentose
phosphoric acids. Biochem. J. 32 : 1626 - 1644
(1938).
- DICKENS, F.
-Recent advances in knowledge of the hexose
monophosphate shunt. Ann. N.Y. Acad. Sc. 75 :
71 - 94 (1958).

- DISCHE, Z. -Synthesis of hexosemono - and diphosphate from adenosine and ribose-5-phosphate in human blood. In: Phosphorus metabolism, hrsg. v. W. D. McELROY und B. GLASS, Vol. 1, Baltimore 1951, S. 171 - 199.
- DISCHE, Z. -The pentose phosphate metabolism in red cells. In: The red blood cell, hrsg. v. C. BISHOP und D. M. SURGENOR, New York - London 1964, S. 189 - 210.
- DOCUMENTA GEIGY -Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. Basel 1960.
- DRABKIN, D. L. and J. H. AUSTIN -Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. J. biol. Chem. 98 : 719 - 733 (1932).
- DRINGS, P., R. ALLNER, N. BROCK, H. BURKERT, M. FISCHER, E. FÖLSCH, H. GERHARTZ, P. GÖTZKY, I. HOPPE, G. KANZLER, H.O. KLEIN, K. MAINZER, H. MARTIN, P. OBRECHT, G. PALME, H. PAULISCH, H. RIEGG, J. C. F. SCHUBERT, U. TRESKE, W. WEISE, D. WILLEMS, H. WILMANN, S. WITTE und G. WOHLBERG -Erfahrungen mit neuartigen N-Lost-Phosphamidestern. Dtsch. med. Wschr. 95 : 491 - 497 (1970).
- DUME, TH. und W. PÖTTGEN -Isolierte Schädigung der Erythropoese unter immunsuppressiver Therapie nach Nierentransplantation. Dtsch. med. Wschr. 95 : 948 - 949 (1970).
- DUDECK, J. -Vereinfachte Regel zur Bestimmung des F - Tests bei partiell - hierarchischen Modellen der Varianzanalyse. Metrica 17 : 232 - 242 (1971).
- ECKHARDT, S., C. SELLEI und F. HARTAI -Klinische Erfahrungen mit Endoxan^R. Münch. med. Wschr. 101 : 2273 - 2275 (1959).
- EIFLER, R. und C. WAGENKNECHT -NADH₂- und NADPH₂-spezifische GSSG-Reduktasen in roten Blutzellen. Acta Biol. Med. German. 13 : 674 - 682 (1964).
- FINCH, C. A., D. H. COLEMAN, A. G. MOTULSKY, D. M. DONOHUE and R. H. REIFF -Erythrokinetics in pernicious anemia. Blood 11 : 807 - 820 (1956).

- FLEISCHER, J. -Die Wirkung längerer Gaben von Prednisolon und Endoxan^R auf das Knochenmark des Kaninchens. *Folia Haemat. N.F.* 7 : 323 - 347 (1963).
- FORNAINI, G., E. BIANCHINI, G. LEONCINI and A. FANTONI -Metabolic aspects of red cells in congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Brit. J. Haemat.* 10 : 23 - 35 (1964).
- FORNAINI, G., G. LEONCINI, P. SEGNI, G. A. CALABRIA and M. DACHA -Relationship between age and properties of human and rabbit erythrocyte G-6-PDH. *Europ. J. Biochem.* 7 : 214 - 222 (1969).
- FRICK, P. G. -Der Erythrocyt als Beispiel biologischer Zweckmäßigkeit. *Schweiz. med. Wschr.* 91 : 1245 - 1249 (1961).
- FRICK, P. G. -Medikamentös bedingte hämolytische Anämien. *Schweiz. med. Wschr.* 94 : 531 - 533 (1964).
- FRICK, P. G. -Blut (Erythrocyten und Hämoglobin). In: *Klinische Pathophysiologie*, hrsg. v. W. SIEGENTHALER, Stuttgart 1970, S. 392 - 405.
- GEHRMANN, G. -Anaemien. In: *Pathologische Physiologie*, hrsg. v. F. GROSSE-BRCKHOFF, 2. Aufl. Berlin-Heidelberg New-York 1969, S. 17 - 54.
- GERHARTZ, H. Die Chemotherapie des Bronchial-Krebses. *Sdbd. Strahlenther.* 41 : 116 - 119 (1959).
- GERHARTZ, H. -Die Chemotherapie der Hämoblastosen. *Ärztl. Wschr.* 14 : 255 - 260 (1959).
- GERHARTZ, H. -Experimentelle und klinische Ergebnisse mit dem Zytostatikum Endoxan^R. In: *Chemotherapie maligner Tumoren*, 2. Bielefelder Symposion 18.4.1959, hrsg. v. H. WILMANNS, Stuttgart 1960, S. 61 - 67.
- GERHARTZ, H. -Vergleichende Untersuchungen zur Toxizität und Seitenwirkung moderner Zytostatika. *Verhandl. Dtsch. Ges. inn. Med.* 68 : 251 - 255 (1962).
- GERHARTZ, H. und W. WEISE -Die Chemotherapie der Autoaggressionskrankheiten. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 67 : 54 - 69 (1967).
- GERLICH, N. -Die Anwendung von Äthyleniminobenzochinonen und "discoupling" agents. In: *Chemotherapeutische Probleme maligner Tumoren*, 2. Folge, hrsg. von F. MEYTHALER, Stuttgart 1960, S. 189 - 199.

- GIRDWOOD, R. H. -Vitamin B₁₂ - und Folsäuremangelkrankheiten bei Menschen. Klin. Wschr. 36 : 933 - 939.
- GREENSTEIN, J. P. -Biochemistry of cancer. Ed. 2. New York 1954 S. 450 - 451.
- GRANICK, S. -The chemistry and functioning of the mammalian erythrocyte. Blood 4 : 404 - 441 (1949).
- GRIGNANI, F. und G. W. LÖHR -Über die Hexokinase in menschlichen Blutzellen. Klin. Wschr. 38 : 796 - 799 (1960).
- GRIMES, A. J. -Glycolysis in young and mature normal human erythrocytes. Nature (London) 198 : 1312 - 1313 (1963).
- GRIMES, A. J., A. MEISLER and J. V. DACIE -Hereditary non-spherocytic haemolytic anaemia: a study of red-cell carbohydrate metabolism in twelve cases of pyruvate-kinase deficiency. Brit. J. Haemat. 10 : 403 - 411 (1964).
- GROSS, R. -Entwicklungen und Probleme der cytostatischen Chemotherapie. Internist 12 : 109 - 115 (1971).
- GROSS, R. und H. E. BOCK -Die Chemotherapie der Tumorerleiden. In: Klinik der Gegenwart, Bd. 5, München - Berlin 1957, S. 235 - 240.
- GROSS, R. und K. LAMBERS -Erste Erfahrungen in der Behandlung maligner Tumoren mit einem neuen N-Last-Phosphamidester. Dtsch. med. Wschr. 83 : 458 - 462 (1958).
- GUEIFI, J., J. ILLES, D. TUSET und R. RAVELEAU -Cyclophosphamid im Krebszentrum Rennes. J. Radiol. 43 : 661 - 662 (1963).
- GÜNTHERBERG, H., J. ROST, J. GAUERT und B. KNEBEL -Bestimmungen von GSSG in roten Blutzellen. Fo. haemat. (Leipzig) 83 : 539 - 542 (1965).
- HARDY, J. D., S. ERASLAN, and W. R. WEBB -Transplantation of the lung. Ann. Surg. (Philadelphia) 160 : 440 - 448 (1964).
- HARRIS, J. W. -The red cell. Cambridge, Mass. 1963
- HEILMEYER, L. -Chemische Krebsbehandlung. In: Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung. 2. Freiburger Symposium, hrsg. v. J. PIRWITZ, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954, S. 204 - 217.

- HELLER, P., H. G. WEINSTEIN,
M. WEST and H. J. ZIMMERMAN -Enzymes in anemia: A study of abnormalities of several enzymes of carbohydrate metabolism in the plasma and erythrocytes in patients with anemia, with preliminary observations of bone marrow enzymes. *Ann. Int. Med.* 53 : 898 - 913 (1960).
- HELLER, P., H. G. WEINSTEIN,
M. WEST and H. J. ZIMMERMAN -Glykolytic, citric acid cycle, and hexose-monophosphate shunt enzymes of plasma and erythrocytes in megaloblastic anemia. *J. Lab. Clin. Med.* 55 : 425 - 434 (1960).
- HERBERT, V. -The megaloblastic anemias. New York 1959.
- HILZ, H. und E. J. KLEMPIEN -Über die Einwirkung von cytostatischen Verbindungen und Nicotinsäureamid auf Ascitestumornucleasen. *Biochem. Z.* 331 : 563 - 576 (1959).
- HINTERBERGER, U., E. OCKEL,
W. GERISCHER-MOTHES und
S. RAPOPORT -Größe und pH-Abhängigkeit der anaeroben Glykolyse und der Hexokinaseaktivität von Erythrocyten und Reticulocyten des Kaninchens. *Acta Biol. Med. Germ.* 7 : 50 - 56 (1961).
- HITZIG, W. H. -Immunsuppressive Therapie. *Praxis* 55 : 61 - 64 (1966).
- HOFFMANN, G. -Kurzer Abriß der Anatomie und Physiologie der Laboratoriumstiere. Jena 1956, S. 25 - 27.
- HOHORST, H. J. -Zum Stoffwechsel der Tumoren. In: Chemotherapie maligner Tumoren, 2. Bielefelder Symposium 18.4.1959, hrsg. v. H. WILMANN, Stuttgart 1960, S. 26 - 35.
- HOLLINGSWORTH, J. W. -Erythrocyte glycolysis in hemolytic diseases. *J. Lab. Clin. Med.* 45 : 920 - 925 (1955).
- HOLZER, H. und H. KRÖGER -Zum Mechanismus der Wirkung von B 518 (Endoxan-Asta) auf das Jensen-Sarkom und zur Hemmung der Chemotherapie von Tumoren durch das Vitamin Nicotinsäureamid. *Klin. Wschr.* 36 : 677 - 678 (1958).
- HORECKER, B. L. and H. H. HIATT -Pathways of carbohydrate metabolism in normal and neoplastic cells. *New England J. Med.* 258 : 177 - 184 und 225 - 232 (1958).
- HORECKER, B. L. and P. Z.
SMYRNIOTIS -6-Phosphogluconic Dehydrogenase. In: Methods in Enzymology, hrsg. v. S. P. COLWICK und N. O. KAPLAN, New York 1955, S. 323 - 327.

HORECKER, B. L.,
P. Z. SMYRNIOTIS and
J. E. SEEGMILLER

-The enzymatic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate. J. Biol. Chem. 193 : 383 - 396 (1951)

HOST, H.

-Regeneration von Knochenmarkzellen bei der Ratte nach Cyclophosphamid oder Ganzkörperbestrahlung. Acta Radiol. (Stockholm) 4 : 337 - 352 (1966).

HOST, H.

-Vergleichende Wirkungen von Cyclophosphamid, Stickstoff-Lost und Ganzkörperbestrahlung auf die Überlebenszeit und auf die weißen Blutkörperchen bei der Ratte. Rad. Res. 27 : 638 - 651 (1966).

HUBER, H., M. CIRESA und
N. SHIRAKURA

-Über die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in den Erythrocyten bei Lebercirrhose. Wien. Z. inn. Med. 44 : 26 - 30 (1963).

HUME, D. M. H. M. LEE,
G. M. WILLIAMS, H. J. O. WHITE,
J. FERRE, J. S. WOLF, G. R.
PROUT, M. SLAPAK, J. O. BRIEN,
S. J. KILPATRIK, H. M. KAUFF-
MAN and R. J. CLEVELAND

-The comparative results of cadaver and related donor renal homografts in man, and immunological implications of the outcome of second and paired transplants. Ann. Surg. (Philadelphia) 164 : 352 - 396 (1966).

INTERNATIONAL UNION OF
BIOCHEMISTRY

- Enzyme Nomenclature. Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry, Amsterdam-London - New York 1965.

JACOB, H. S. and J. H. JANDL

-Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. I. Mechanism of hemolysis. J. Clin. Invest. 41, 779 - 792 (1962).

JACOB, H. S. and J. H. JANDL

-Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. II. Studies in vivo. J. Clin. Invest. 41 : 1514 - 1523 (1962).

JACOBASCH, G.

-Pyruvatkinasemangel und einige Probleme der Glykolyseeregulierung. Fol. haemat. (Leipzig) 83 : 407 - 415 (1965).

JONES, P. E. H. and R. A. Mc
CANCE

-Enzyme activities in the blood of infants and adults. Biochem. J. 45 : 464 - 467 (1949).

JUNG, S.

-Zucht und Haltung der wichtigsten Laboratoriumsversuchstiere. Jena 1958, S. 91.

- KAHRIG, C. und S. RAPOPORT -Atmung und Glukose-Phosphatdehydrogenase-Aktivität roter Blutkörperchen in verschiedenen Reifungs- und Alterungsstadien. Fol. haemat. (Leipzig) 78 : 408 - 415 (1962).
- KEITT, A.S. -Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis. Amer. J. Med. 41 : 762 - 785 (1966).
- KEUS, B. -Klinische Erfahrungen mit dem zyklischen Phosphamidester ENDOXAN^R. Inaug. Diss. Freiburg/Br. 1963.
- KÖLLE, G. -Knochenmarksschädigung bei immunsuppressiver Therapie der juvenilen rheumatoiden Arthritis und des Still-Syndroms mit Azathioprin. Dtsch. med. Wschr. 94 : 2268 - 2273 (1969).
- KONDO, K. -Wirkung von ENDOXAN^R auf die blutbildenden Gewebe junger erwachsener Mäuse. Arch. histol. jap. 24 : 303 - 317 (1964).
- KORNBERG, A. and B. L. HORECKER -Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. In: Methods in Enzymology, hrsg. v. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, New York 1955, S. 323 - 326.
- KOWALSKI, E., M. KOPEC, Z. SZOT und M. WEZNIEWSKA -Über einige Erythrocytenenzyme bei verschiedenen Krankheitszuständen. Fol. haemat. (Leipzig) 76 : 446 - 451 (1959).
- KRAKOFF, I. H. -Mechanism of drug action in leukemia. Amer. J. Med. 28 : 735 - 750 (1960).
- KUHLMEY, W. -Über Erythrocytenglykolyse. Fol. haemat. (Leipzig) 83 : 423 - 426 (1965).
- KÜNKEL, H. A. und H. J. MAUSS -Strahlenbiologische Untersuchungen mit chrommarkierten Erythrocyten. Über die Wirkung von Röntgenstrahlen und zytostatischen Substanzen auf die "Erythrocytenlebensdauer". Sdbd. Strahlenther. 56 : 100 - 104 (1964).
- KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN -Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, 4. Aufl. Stuttgart 1970, S. 269 - 273.
- LAWKOWICZ, W., P. CZERSKI -Comparative Haematology of Laboratory Animals (Selected Aspects). Proc. 10th Congr. Europ. Soc. Haemat. Strasbourg 1965, Acta haemat. 36 : 13 - 25 (1966).

- LEGOWSKI, ST. und
K. G. von BOROVIČENY -Exakte Hämoglobinbestimmung in der täglichen
Praxis. Dtsch. med. Wschr. 87 : 1953 - 1960
(1962).
- LÖHR, G. W. -Vergleichende Untersuchungen über die Hemmung
der Phosphoglyceraldehyddehydrogenase durch ver-
schiedene cytotatische Substanzen. Klin. Wschr.
35 : 1163 - 1166 (1957).
- LÖHR, G. W. -Beitrag zum Wirkungsmechanismus des zyklischen
N-Last-Phosphamidesters Endoxan^R auf den Tumor-
stoffwechsel. In: Chemotherapie maligner Tumore
2. Bielefelder Symposion 18.4.1959, hrsg. v. H.
WILMANN, Stuttgart 1960, S. 36 - 43.
- LÖHR, G. W. -Die Fermente der Erythrocyten und ihre funktionelle
Bedeutung. Folia Haemat. N. F. 9 : 240 - 258
(1964).
- LÖHR, G. W. -Die enzymopenischen Erythropathien. Verh. dtsc.
Ges. Inn. Med. 70 : 495 - 521 (1964).
- LÖHR, G. W. -Die Reifung des Retikulozyten. Acta haemat. 36
273 - 295 (1966).
- LÖHR, G. W. und CH. LAUSECKER -zit. n. G. W. LÖHR, Verh. dtsc. Ges. Inn. M.
70 : 495 - 521 (1964).
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Hämolytische Erythrocytopathie durch Fehlen von
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in roten Blut-
zellen als dominant vererbliche Krankheit. Klin.
Wschr. 36 : 865 - 869 (1958).
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Zellstoffwechsel und Zellalterung. Klin. Wschr.
37 : 833 - 843 (1959).
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen
hämolytischen Anämien. Dtsch. med. Wschr. 86
27 - 39 und 87 - 93 (1961).
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Methoden
der enzymatischen Analyse, hrsg. v. H. U. BERG-
MEYER, Weinheim/Bergstr. 1962, S. 744 - 751.
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Zur Biochemie der Erythrocytenalterung. Fol.
haemat. (Leipzig) 78 : 385 - 396 (1962).
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit
Glutathionreductase-Mangel. Med. Klin. 57 :
1521 - 1525 (1962).

- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Zur Biochemie einiger angeborener haemolytischer Anämien. *Folia Haemat. N.F.* 8 : 377 - 397 (1963).
- LÖHR, G. W. und H. D. WALLER -Die Diagnostik nichtsphärozytärer hämolytischer Anämien mit Enzymdefekten in der Glykolyse. *Dtsch. med. Wschr.* 91 : 1933 - 1937 (1966).
- LÖHR, G. W., H. D. WALLER, und O. KARGES -Quantitative Fermentbestimmungen in roten Blutzellen. *Klin. Wschr.* 35 : 871 - 875 (1957).
- LÖHR, G. W., H. D. WALLER, O. KARGES, B. SCHLEGEL und H. D. MÜLLER -Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrocyten. *Klin. Wschr.* 36 : 1008 - 1013 (1958).
- LÖHR, G. W. und H. WILMANN -zit. n. G. W. LÖHR und H. D. WALLER, *Klin. Wschr.* 37 : 833 - 843 (1959).
- LOWY, B. A., B. RAMOT and I. M. LONDON -Adenosine triphosphate metabolism in the rabbit erythrocyte in vivo and in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 75 : 148 - 155 (1958).
- LUNDGAARD, E. -Die Glykolyse. *Ergebn. Enzymforsch.* 2 : 179 - 203 (1953).
- MARKS, P. A. -A relationship between human erythrocyte aging and the activities of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenases. *J. Clin. Invest.* 36 : 913 (1957).
- MARKS, P. A. -Red cell glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenases and nucleoside phosphorylase. *Science* 127 : 1338 - 1339 (1958).
- MARKS, P. A., A. B. JOHNSON, and E. HIRSCHBERG -Effect of age on the enzyme activity in erythrocytes. *Proc. nat. Acad. Sci.* 44 : 529 - 536 (1958).
- MARKS, P. A., A. B. JOHNSON, R. DeBELLIS and J. BANKS -Vortr. VII. Intern. Congr. Biochem. Wien 1958, zit. n. G. W. LÖHR und H. D. WALLER, *Klin. Wschr.* 37 : 833 - 843 (1959).
- MARKS, P. A., A. B. JOHNSON, E. HIRSCHBERG and J. BANKS -Studies on the mechanism of aging of human red blood cells. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 75 : 95 - 105 (1958).
- MAUSS, H. J. -Wirkung von Zytostatika auf die Erythrocytenüberlebenszeit und auf die Erythropoese. *Zbl. Gynäk.* 85 : 633 - 638 (1963).

- MAUSS, H. J. und
H. A. KÜNKEL -Tierexperimentelle Untersuchungen über den Einfluß
zytostatischer Substanzen auf die Erythropoese.
Strahlenther. 116 : 443 - 447 (1961).
- McILVANIE, S. K. and
J. D. MacCARTHY -Hepatitis in association with prolonged
6-mercaptopurine therapy. Blood 14 : 80 - 85
(1959).
- MERRIL, J. P. -Medical management of the transplant patient. In:
Human transplantation, hrsg. v. F. T. RAPOPORT
und J. DAUSSET, New York - London 1968, S. 66
79.
- MEYTHALER, F. -Die Nebenwirkungen der Cytostatica. Verh. dtsch.
Ges. inn. Med. 67 : 505 - 512 (1961).
- MICHOT, F. -Erfahrungen in der Langzeitbehandlung von
Kollagenkrankheiten mit Azathioprin (Imuran^R).
Med. Klin. 63 : 1262 - 1266 (1968).
- MÜLLER-SEIFERT -Taschenbuch der medizinisch-klinischen
Diagnostik. Hrsg. v. VON KRESS, 69. Aufl.
München 1966, S. 573.
- MURPHY, J. R. -Erythrocyte metabolism. II. Glucose metabolism
and pathways. J. Lab. Clin. Med. 55 : 286 -
302 (1960).
- NEGELEIN, E. und E. HAAS -Über die Wirkung des Zwischenferments. Biochem.
Z. 282 : 206 - 220 (1935).
- NISSEN-MEYER, R. und H. HOST -Vergleich zwischen den haematologischen Neben-
wirkungen von Cyclophosphamid und N-Last.
Cancer Chemother. Rep. 9 : 51 - 55 (1960).
- PFLEIDERER, G., D. JECKEL und
TH. WIELAND -Zum Wirkungsmechanismus der Milchsäure-
Dehydrogenase. Die schützende Wirkung von
Coenzym-Addukten gegenüber denaturierenden
Agentien. Biochem. Z. 329 : 104 - 111 (1957).
- PHILIPS, F. S., S. S. STERNBERG,
D. A. CLARKE and
G. H. HITCHINGS -Effects of 6-mercaptopurine in mammals. Proc.
Amer. Ass. Cancer Res. 1 : 42 - 43 (1953).
- PLIESS, G. und D. FASSBENDER - Die Wirkung subletaler Dosen von Endoxan^R auf
die Hämpoese der Ratte. Arzneimittel-Forsch. 11
179 - 188 (1961).
- PRANKERD, T. A. J. -The metabolism of the human erythrocyte: a review
Brit. J. Haemat. 1 : 131 - 145 (1955).

- PRANKERD, T. A. J. -Inborn errors of metabolism in red cells of congenital hemolytic anemias. *Amer. J. Med.* 22 : 724 - 729 (1957).
- PRANKERD, T. A. J. -Studies on the pathogenesis of haemolysis in hereditary spherocytosis. *Quart. J. Med.* 29 : 160 - 172 (1960).
- PRANKERD, T. A. J. -The red cell. Oxford 1961.
- PRANKERD, T. A. J. and K. J. ALTMAN -A study of the metabolism of phosphorus in mammalian red cells. *Biochem. J.* 58 : 622 - 633 (1954).
- PÜTTER, J. -Stoffwechselwirkungen des Tris-Äthylenimino-p-benzochinons. In: *Chemotherapeutische Probleme maligner Tumoren*, hrsg. v. F. MEYTHALER, Stuttgart 1960, S. 18 - 25.
- RACKER, E. -Glutathione reductase (Liver and yeast). In: *Methods in enzymology*, Vol. 2, hrsg. v. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, New York 1955, S. 722 - 725.
- RAPOPORT, S. -Reifung und Alterungsvorgänge in Erythrocyten. *Fol. haemat. (Leipzig)* 78 : 364 - 381 (1962).
- RAPOPORT, S. M. -Stoffwechselregulation der roten Blutzelle. *Fol. haemat. (Leipzig)* 83 : 298 - 312 (1965).
- RAPOPORT, S. M. -Medizinische Biochemie, 4. Aufl., Berlin 1966, S. 615 - 627.
- RAPOPORT, S. M. -zit. n. H. D. WALLER: Glutathione reductase deficiency. In: *Hereditary disorders of erythrocyte metabolism*, hrsg. v. E. BEUTLER, New York - London 1967, S. 185 - 204.
- RAPOPORT, S. and J. LUEBERING -The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes: the existence of a diphosphoglycerate mutase. *J. Biol. Chem.* 183 : 507 - 516 (1950).
- RAPOPORT, S. and J. LUEBERING -Glycerate-2,3-diphosphatase. *J. Bio. Chem.* 189 : 683 - 690 (1951).
- RAPOPORT, S., U. HINTERBERGER und E. C. G. HOFMANN -Die begrenzende Rolle der Hexokinase-Reaktion für die anaerobe Glykolyse der roten Blutzellen. *Naturwiss.* 48 : 501 - 502 (1961).

- REIMER, E. E. und G. BRICHTA -Über Erythroblastenkernveränderungen unter Cytostatikatherapie. 5. Int. Kongr. Chemotherapie Wien 1967, Vol. II/1, S. 203 - 207.
- REMMER, H. -Kritik an dem Verfahren zur Standardisierung von Hämoglobinbestimmungen. Klin. Wschr. 34 : 760 - 761 (1956).
- REMMER, H. -Kritische Wertung der Hämoglobinbestimmungsmethoden. Internist 1 : 232 - 236 (1960).
- ROITT, I. M. -The inhibition of carbohydrate metabolism in ascites-tumor cells by ethyleneimines. Biochem. J. 63 : 200 - 307 (1956).
- RUBINSTEIN, D., P. OTTOLENGHI and O. F. DENSTEDT -The metabolism of the erythrocyte. XIII. Enzyme activity in the reticulocyte. Canad. J. Biochem. Physiol. 34 : 222 - 235 (1956).
- SALSER, J. S. and M. E. BALIS -The mechanism of action of 6-mercaptopurine. I. Biochemical effects. Cancer Res. 25 : 539 - 543 (1965).
II. Basis for specificity. Cancer Res. 25 : 544 - 551 (1965).
- SARI, B., A. PREKOPA, P. DEMENY, -A veralakeltemek enzimologiai vizsgálatának und S. DAN gyakorlati és elméleti problémái. Haemat. hung. 5 : 91 - 101 (1965).
- SAUERBIER, W. -Die normale Lebenszeit und die Kinetik des Auf- und Abbaus der Erythrocyten beim Kaninchen. Fol. haemat. (Leipzig) 76 : 258 - 272 (1959).
- SCHERMER, S. -In: Pathologie der Laboratoriumstiere, hrsg. v. P. COHRS, R. JAFFE und H. MEESEN, Berlin 1958, S. 176 - 187.
- SCHEUCH, D. und S. RAPOPORT -Intrazelluläre Regulation der Aktivität einiger SH-Enzyme durch Glutathion. Fol. haemat. (Leipzig) 78 : 349 - 355 (1962).
- SCHLEGEL, B. -Formveränderungen transfundierter Erythrocyten. Bibl. haemat. (Basel) 2 : 99 - 103 (1955).
- SCHLEGEL, B. und M. BÖTTNER -Innere Krankheiten und Lebensdauer transfundierter Erythrocyten. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 58 : 732 - 735 (1952).

- SCHMÄHL, D. -Karzinogene Wirkung von Cyclophosphamid und Triazichon bei Ratten. Dtsch. med. Wschr. 92 : 1150 - 1152 (1967).
- SCHMÄHL, D. -Nebenwirkungen cytostatischer Therapie unter besonderer Berücksichtigung potentieller carcinogener Wirkung. Internist 12 : 115 - 119 (1971).
- SCHMIDT, C. G. -Beeinflussung von Fermenten in menschlichen und experimentellen Tumoren durch Zytostatika. In: Chemotherapie maligner Tumoren, 2. Bielefelder Symposion 18.4.1959, hrsg. v. H. WILMANN, Stuttgart 1960, S. 44 - 48.
- SCHMIDT, C. G. -Kancerogene Effekte von Immunsuppressiva. Dtsch. med. Wschr. 94 : 508 (1969).
- SCHMIDT, C. G. -Alkylierende Cytostatika. Internist 12 : 119 - 127 (1971).
- SCHMITZ, G. und R. GROSS -Erste klinische Erfahrungen mit ultrahohen Einzeldosen von Cyclophosphamid. Med. Welt 18 : 985 - 989 (1967).
- SCHNEIDER, A. S., J. DUNN, K. H. IBSEN and J. M. WEINSTEIN -Triosephosphate isomerase deficiency. B. Inherited triosephosphate isomerase deficiency. Erythrocyte carbohydrate metabolism and preliminary studies of the erythrocyte enzymes. In: Hereditary disorders of erythrocyte metabolism, hrsg. v. E. BEUTLER, New York - London 1967, S. 273 - 278.
- SCHNEIDER, A. S., W. N. VALENTINE, M. HATTORI and H. L. HEINS jr. -Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. New Engl. J. Med. 272 : 229 - 235 (1965).
- SCOTT, E. M., J. W. DUNCAN and V. EKSTRAND -Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. J. Biol. Chem. 238 : 3928-3933 (1963).
- SELIGER, H. -Neuere Ergebnisse über die Wirkung von 6-Mercaptopurin und Hydrocortison bei malignen Tumoren. Krebsarzt 11 : 159 - 163 (1956).
- SHERLOCK, SH. -Krankheiten der Leber- und der Gallenwege. Dtsch. Übers. u. Bearb. v. J. EISENBURG. 3. Aufl., München 1965, S. 354.

- SINGER, K., J. C. KING and S. ROBIN -The life span of the megalocyte and the hemolytic syndrome of pernicious anemia. J. Lab. Clin. Med. 33 : 1068 - 1076 (1948).
- SKIPPER, H. E. -On the mechanism of action of 6-mercaptopurine. Ann. N. Y. Acad. Sc. 60 : 315 - 321 (1954).
- SLEIN, M. W., G. T. CORI and C. F. CORI -A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. J. Biol. Chem. 186 : 763 - 780 (1950).
- SONKA, J., L. KAIPAREK und V. KOHOUTEK -Der Einfluß einiger Cytostatica auf den Glycidmetabolismus der Erythrocyten. Fol. haemat. (Leipzig) 78 : 75 - 88 (1962).
- STADIE, W. C. -A method for the determination of methemoglobin in blood. J. Biol. Chem. 41 : 237 - 241 (1920).
- STARZL, T. E. -Experience in renal transplantation. Philadelphia 1964, S. 130 - 141.
- STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, D. T. ROWLANDS, C. H. KIRKPATRICK, W. E. C. WILSON, D. RIFKIND and W. R. WADDELL -Immunosuppression after experimental and clinical homotransplantation of the liver. Ann. Surg. (Philadelphia) 160 : 411 - 438 (1964).
- STOBBE, H. -Hämatologischer Atlas. 3. Aufl. Berlin 1970, S. 489 - 490.
- STRUBELT, O. -Die Lebensdauer von Erythrocyten unter der Einwirkung des Cytostaticums 2,3,5-Trisäthyleniminobenzochinon-(1,4) und des Anabolikums Methenolon-önanthat. Arzneimittel Forsch. 15 : 1051 - 1054 (1965).
- STRUMIA, M. M., A. B. SAMPLE and E. D. HART -An improved micro hematocrit method. Amer. J. Clin. Path. 24 : 1016 - 1024 (1954).
- SZEINBERG, A., D. CAHANE -Erythrocyte adenylate - kinase deficiency. Lancet 1969 I, 1. S. 315 - 316 (1969).
- TANAKA, K. R. and W. N. VALENTINE -Pyruvate kinase deficiency. In: Hereditary disorders of erythrocyte metabolism, hrsg. v. E. BEUTLER, New York - London 1967, S. 229 - 243.
- TANAKA, K. R., W. N. VALENTINE and S. MIWA -Pyruvate kinase deficiency hereditary non-spherocytic hemolytic anemia. Blood 18 : 784 - 788 (1961).

- TANAKA, K. R.,
W. N. VALENTINE and
S. MIWA -Pyruvate kinase deficiency hereditary non-
spherocytic hemolytic anemia. *Blood* 19 : 267 -
295 (1962).
- ULTMANN, J. E., G. A. HYMAN,
J. L. HARVEY and A. R. DENTE -Erythrocyte glykolysis in patients with malignant
neoplasms and other chronic diseases. *Blood* 12 :
1114 - 1121 (1957).
- VALENTINE, W. N.,
A. S. SCHNEIDER, M. A. BAUGHAN
D. E. PAGLIA and H. L. HEINS jr. -Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate
isomerase deficiency. *Amer. J. Med.* 41 : 27 -
41 (1966).
- VALENTINE, W. N.,
K. R. TANAKA and S. MIWA -A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect
(pyruvate kinase) in three subjects with
congenital non-spherocytic hemolytic anemia.
Tr. Ass. Amer. Physicians 74 : 100 - 110 (1961).
- VALENTINE, W. N., F. A. OSKI,
D. E. PAGLIA, M. A. BAUGHAN,
A. S. SCHNEIDER and
J. L. NAIMAN -Hereditary hemolytic anemia with hexokinase
deficiency. *New Engl. J. Med.* 276 : 1 - 11
(1967).
- VOGELL, M., F. R. BISHAI,
TH. BÜCHER, M. KLINGENBERG,
D. PETTE und E. ZEBE -Über strukturelle und enzymatische Muster in
Muskeln von *Locusta migratoria*. *Biochem. Z.*
332 : 81 - 117 (1959).
- VON KLEIN-WISENBERG und
K. G. VON BOROVICZENY -Das quantitative Blutbild. *Internist* 9 : 33 - 41
(1968).
- WAGNER, J. und V. JANATA -Über das gebundene Glutathion in Erythrocyten.
Fol. haemat. (Leipzig) 83 : 522 - 525 (1965).
- WALLER, H. D. -zit. n. S. WITTE: Hochdosierte TRIS-Anwendung
unter dem Schutz von Knochenmarktransfusionen.
In: Chemotherapeutische Probleme maligner
Tumoren, 2. Folge, hrsg. v. F. MEYTHALER,
Stuttgart 1960, S. 165 - 169.
- WALLER, H. D. -Der Stoffwechsel der Erythrocyten und seine Be-
deutung für die Stabilisierung des Hämoglobins.
Folia Haemat. N. F. 9 : 259 - 278 (1964).
- WALLER, H. D. -Glutathione reductase deficiency. In: Hereditary
disorders of erythrocyte metabolism, hrsg. v. E.
BEUTLER, New York - London 1967, S. 185 - 204.

- WALLER, H. D. und U. FEINE -Unveröffentlichte Ergebnisse, zit. n. H. D.
WALLER: Glutathione reductase deficiency. In:
Hereditary disorders of erythrocyte metabolism,
hrsg. v. E. BEUTLER, New York - London 1967,
S. 185 - 204.
- WALLER, H. D. and G. W. LÖHR -Hereditary non-spherocytic enzymopenic hemolytic
anemia with pyruvate kinase deficiency. Proc. IX
Cong. Internat. Soc. Hemat., Mexiko City, 1962
Vol. 1, New York - London 1964, S. 257 - 263.
- WALLER, H. D. und G. W. LÖHR -Genetische Enzymdefekte in der Glykolyse als
Ursache nichtsphärocytärer hämolytischer Anämien
Nova Acta Leopoldina N. F. 26 : 163 - 174
(1963).
- WALLER, H. D. und G. W. LÖHR -Die Diagnostik enzymopenischer hämolytischer
Anämien mit Mangel oder Instabilität des
reduzierten Glutathions. Dtsch. med. Wschr. 91 :
1603 - 1605 (1966).
- WALLER, H. D., G. W. LÖHR
und M. TABATABAI -Hämolyse und Fehlen von Glucose-6-
Phosphatdehydrogenase in roten Blutzellen. (Eine
Fermentanomalie der Erythrocyten). Klin. Wschr.
35 : 1022 - 1027 (1957).
- WALLER, H. D., G. W. LÖHR
E. ZYSNO, W. GEROK, D. VOSS
und G. STRAUSS -Glutathionreduktasemangel mit hämatologischen
und neurologischen Störungen (Autosomal dominant
vererbliche Bildung eines pathologischen Enzyms).
Klin. Wschr. 43 : 413 - 426 (1965).
- WARBURG, O. -Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.
- WARBURG, O. und
W. CHRISTIAN -Über Aktivierung der Robisonischen Hexose-Mono-
Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Ge-
winnung aktivierender Fermentlösungen. Biochem.
Z. 242 : 206 - 227 (1931).
- WARBURG, O., W. CHRISTIAN
und A. GRIESE -Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zu-
sammensetzung und Wirkungsweise. Biochem. Z.
282 : 157 - 205 (1935).
- WILMANN, W. -Zum Wirkungsmechanismus von Folsäure- und
Purinantagonisten bei der Behandlung akuter
Leukämien. Folia Haemat. N. F. 8 : 118 - 128
(1963).

- WILMANN, W. -Die Behandlung akuter Leukämien auf enzym-chemischer Grundlage. Dtsch. med. Wschr. 90 : 887 - 888 (1965).
- WILMANN, W. -Antimetabolite. Internist 12 : 127 - 135 (1971).
- WINTROBE, M. M. -Clinical hematology. Philadelphia 1968, S. 118 - 184.
- WOLF, F. und S. Witte -4. Internat. Sympos. radioakt. Isotopen, Bad Gastein 1960. Zit. n. S. WITTE: Hochdosierte TRIS-Anwendung unter dem Schutz von Knochenmarktransfusionen. In: Chemotherapeutische Probleme maligner Tumoren, 2. Folge, hrsg. v. F. MEYTHALER, Stuttgart 1960, S. 165 - 169.
- WOLF, F., S. WITTE und G. KLEYENSTEIBER -Der Einfluß cytostatischer Behandlung auf die Erythrocytenlebensdauer. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 66 : 1041 - 1044 (1960).
- WOODS, M., J. HUNTER and D. BURK -Regulation of glucose utilization in tumors by a stress-modified insulin:anti-insulin system. J. Nat. Cancer Inst. 16 : 351 - 404 (1955).
- YOSHIKAWA, H. and S. MINAKAMI -Regulation of glycolysis in human red cells. Fol. haemat. (Leipzig) 89 : 357 - 373 (1968).
- ZUKOSKI, C. F. and J. W. CALLAWAY -Effect of B. W. 57 - 322, 6-methyl-mercaptopurine urethane plus 6-azauracil, and prednisolone on renal homograft survival. Fed. Proc. 21 : 39 (1962).
- ZUKOSKI, C. F., J. W. CALLAWAY and W. G. PHEA -Prolongation of canine renal homograft survival by antimetabolites. Transplantation 1 : 293 - 297 (1963).
- Die Abkürzungen in den Literaturangaben sind folgenden Verzeichnissen entnommen:
- ARTELT, W., E. HEISCHKE und C. WEHMER -Periodica medica. Titelabkürzungen medizinischer Zeitschriften. 4. Aufl. Stuttgart 1952.
- CLEGG, H. A. (Hrsg.) -World medical periodicals. World medical Association, Kent 1961.

Ich danke Herrn Professor Dr. K. Mainzer für die Überlassung des Themas und seine Hilfe bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Professor Dr. P. Schölmerich danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der II. Medizinischen Klinik durchführen zu dürfen.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. J. Michaelis, Institut für Medizinische Dokumentation und Statistik der Universität Mainz und Herrn Professor Dr. J. Dudeck, Statistisches Institut der Universität Gießen für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Ergebnisse.

LEBENS LAUF

Am 26. März 1945 wurde ich, Karl - August Müller, als zweiter Sohn des Kaufmanns Gregor Müller und seiner Ehefrau Rosa geb. Lück in Enspel/Westerw. geboren. Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich die Realschule Hachenburg und das Staatl. Neusprachliche Gymnasium Altenkirchen/Westerw. In dieser Schule bestand ich im März 1965 die Reifeprüfung.

Ab Sommersemester 1965 studierte ich an der Universität Frankfurt/Main Medizin. Nach der ärztlichen Vorprüfung im März 1968 wechselte ich zum klinischen Studium an die Universität Mainz, wo ich im Juni 1971 das Staatsexamen ablegte.

Die insgesamt zwölfmonatige Medizinalassistentenzeit absolvierte ich an der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Paulinenstift Nastätten/Taunus und der II. Medizinischen Universitätsklinik Mainz, wo ich nach Erteilung der Approbation im August 1972 als Verwalter einer Wissenschaftlichen Assistentenstelle arbeite.

